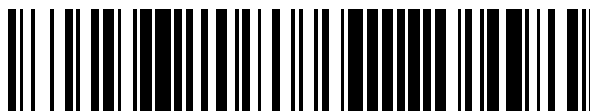


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 347**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2010 E 10749570 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2470656**

54 Título: **Composiciones para inhibir expresión genética y usos de las mismas**

30 Prioridad:

27.08.2009 US 275252 P
08.09.2009 US 240553 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2015

73 Titular/es:

IDERA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
167 Sidney Street
Cambridge, MA 02319, US

72 Inventor/es:

AGRAWAL, SUDHIR;
KANDIMALLA, EKAMBAR;
PUTTA, MILLIKARJUNA;
LAN, TAO;
BHAGAT, LAKSHMI;
WANG, DAQING y
YU, DONG

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 538 347 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

Composiciones para inhibir expresión genética y usos de las mismas

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con compuestos, composiciones y métodos de uso para la inhibición de expresión y/o actividad genética o para diagnóstico, tratamiento y/o prevención de enfermedades y/o condiciones que responden a la inhibición de la expresión y/o actividad genética.

Resumen de la técnica relacionada

- 10 Una metodología para inhibir la expresión genética es la tecnología antisentido o inhibición de ARN (ARNi). Estas metodologías hacen uso del enlazamiento específico para secuencias de ADN y/o ARN con base en oligonucleótidos a objetivos de ARNm, microARN, ARNpre o ARN mitocondrial seleccionados y la inhibición de la traducción que resulta de los mismos. Está inhibición basada en oligonucleótidos de traducción y finalmente de la expresión genética es el resultado de uno o más mecanismos celulares, los cuales pueden incluir pero no se limitan a (i) bloqueo directo (estérico) de la traducción, (ii) inhibición mediada por la H-ARNsa, y (iii) inhibición mediada por ARNi (esto es, ARNi de interferencia corto (ARNsi), microARN (ARNmi), ARNi dirigido a ADN (ddARNi) y ARNi de cadena sencilla (ssARNi)).

- 15 La historia de la tecnología antisentido ha revelado que en tanto la determinación de los oligonucleótidos antisentido que se enlazan a ARNm es relativamente fácil, la optimización de los oligonucleótidos antisentido que tienen verdadero potencial para inhibir la expresión genética y por lo tanto ser buenos candidatos clínicos no lo es. De acuerdo con lo anterior, si una metodología basada en oligonucleótidos para subregular la expresión genética va a ser exitosa, hay necesidad para optimizar los oligonucleótidos antisentido que alcanzan más eficientemente este resultado. Tales oligonucleótidos antisentido optimizados podrían ser utilizados solos o en conjunción con otras composiciones profilácticas y/o terapéuticas.

- 20 Desde que Zemecknik y Stephenson publicaron la primera demostración de la utilización de oligonucleótidos antisentido como medio para inhibir la traducción de proteínas virales (Zemecknik y Stephenson (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75:285-288), ha habido un gran interés en la utilización de compuestos basados en oligonucleótidos para inhibir la expresión de genes. Estos esfuerzos iniciales utilizaron oligodesoxirribonucleótidos u oligorribonucleótidos no modificados, de cadena sencilla (Agrawal) et al. (1992) Ann. NY Acad. Sci. 660:2-10) los cuales son inherentemente inestables *in vivo*, para enlazar ARNm *in vivo* y crear una plantilla de ARN de cadena doble para degradación enzimática o por ARNse. Se han hecho esfuerzos subsiguientes para determinar la utilidad de los oligodesoxirribonucleótidos que incorporaba enlaces fosforotioato y/o metilfosfonato resistentes a la nucleasa (Agrawal et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:7079-7083; Metelev & Agrawal US 5,652,355; Metelev & Agrawal US 6,143,881; Matsukura et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7706).

- 25 Otra clase de moléculas basadas en ARN que inhiben la expresión genética son denominadas como ribozimas. Las ribozimas forman estructuras de tallo en bucle y se enlazan al ARN objetivo para mediar su escisión directamente (Cech, T. (1990) Ann. Rev. Biochem. 59:543). Las ribozimas se enlazan selectivamente a ARN objetivo y catalizan una transesterificación o una reacción de hidrólisis para escindir enlaces fosfodiésteres específicos en ARN de cadena sencilla. Si se introducen en las células, las ribozimas tienen el potencial de enlazarse a un ARNm objetivo e inhibir la traducción de tal ARNm. Como sucede con las tecnologías antisentido de cadena sencilla, la estabilidad de actividad de las ribozimas han mejorado a través de la incorporación de ciertas modificaciones químicas en la estructura de la ribozima (Goodchild US 6,204,027; Goodchild US 6,573,072). En tanto las tecnologías de oligonucleótidos antisentido y ribozima continúan avanzando, se están haciendo descubrimientos con otras tecnologías basadas en oligonucleótidos.

- 30 Con base en los descubrimientos pioneros de Fire y Mello (Fire et al. (1998) Nature, 391:806-811), los esfuerzos han girado hacia las tecnologías de interferencia de ARN (ARNi) (por ejemplo, ARN de interferencia corta (ARNsi), microARN (ARNmi), ARNi dirigido a ADN (ddARNi), y ARNi de cadena sencilla (ssARNi)) en sistemas mamíferos. iARN se refiere al proceso de inhibición postranscripción de la expresión genética utilizando oligonucleótidos cortos que están diseñados para hibridar a objetivos de ARN específicos (Fire et al. (1998) Nature 391:806-811; Zamore et al. (2000) Cell, 101:25-33). En el caso de ARNsi, las moléculas de ARN de cadena doble, cortas, utilizan maquinaria enzimática celular para escindir las moléculas de ARN objetivo homólogas. (Rana (2007) Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 8:23-36). Las tecnologías de ARNi de cadena doble se basan en la administración o expresión de ARN de cadena doble (ARNds), el cual una vez dentro de la célula, es enlazado por una enzima denominada cortadora y se escinde en 21-23 nucleótidos. El complejo resultante cortador ARNds es suministrado e interactuado con un complejo que contiene Argonaut de proteínas denominado como complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Se cree que el RISC está presente en células para romper catalíticamente moléculas de ARNm específicas. Una vez enlazado por el RISC, el ARNds es desatado dando

como resultado un complejo ARNss-RISC, el cual es capaz de hibridar a ARNm objetivo. Una vez hibridado, el complejo RISC rompe el ARNm. En algunos casos, los procesos específicos de ARNs de corte han sido eludidos utilizando composiciones de ARNi de cadena sencilla (ssARNi) que interactúan directamente con RISC para alcanzar la inhibición de la expresión genética (Holen et al. (2003) Nuc. Acids Res. 31:2401-2407). Aunque las tecnologías de ARNi son capaces de enlazar selectivamente a ARNm, tales moléculas también han sido reconocidas por inducir la estimulación inmune no específica a través de la interacción con TLR3 (Kleinman et al., (2008) Nature 452:591-597; De Veer et. al. (2005) Immun. Cell Bio. 83:224-228; Kariko et al. (2004) J. Immunol. 172:6545-6549). Esta activación inmune no específica ha generado preguntas con referencia a la utilidad de las tecnologías de ARNi como agentes farmacéuticos.

Aunque cada una de estas tecnologías basadas en antisentido han sido utilizadas con algún éxito, como resultado de estar basadas en oligonucleótidos, cada una de estas tecnologías tiene el problema inherente de ser inestable *in vivo* y de tener el potencial de producir efectos fuera del objetivo, por ejemplo estimulación inmune no buscada (Agrawal & Kandimalla (2004) Nature Biotech. 22:1533-1537). En el caso del ARNs, estos oligonucleótidos parecen tener el problema adicional de administración ineficiente *in vivo* a las células (Medarova et. al (2007) Nature Med. 13:372-377). A pesar de muchos ensayos clínicos de candidatos fármacos oligonucleótidos antisentido, solo uno de tales compuestos ha sido aprobado como fármaco por la FDA. Este compuesto antisentido fue aprobado para el tratamiento de CMV, pero nunca ha sido comercializado como un producto. Adicionalmente, no se ha aprobado ningún candidato a fármaco de ribozima o ARNs por parte de la FDA.

Las metodologías para utilizar cada una de estas tecnologías han estado enfocadas en dirigirse a la bioestabilidad, reconocimiento de objetivos (por ejemplo, permeabilidad celular, termoestabilidad), y actividad *in vivo*. Frecuentemente, estas han representado consideraciones competitivas. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido tradicionales utilizan enlaces internucleótidos de éster de fosfato, los cuales demuestran ser bastante inestables biológicamente para hacer efectivos. Así, ha habido esfuerzos para modificar los oligonucleótidos antisentido para hacerlos más estables biológicamente. Las metodologías iniciales se enfocaron en la modificación de los enlaces internucleótidos para hacerlos más resistentes a la degradación por parte de las nucleasas celulares. Estas metodologías llevaron al desarrollo de oligonucleótidos antisentido que tienen una variedad de enlaces internucleótidos de origen no natural, tales como fosforotioato, metilfosfonato (Sarin et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:7448-7451), y enlaces basados en péptidos (Matsukura et. al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7706; Agrawal et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:7079-7083; Miller (1991) Bio-Technology 9:358). Sin embargo, estas modificaciones hicieron que las moléculas disminuyeran su especificidad al objetivo y produjeran actividades biológicas no deseadas.

Tecnologías posteriores para mejorar la estabilidad y retener la especificidad y la actividad biológica utilizaron oligonucleótidos de esqueleto mixto, los cuales contienen uniones internucleótidos fosfodiéster y fosforotioato. Este esqueleto mixto dio como resultado oligonucleótidos que retenían o mejoraban su actividad biológica en comparación con oligonucleótidos con solamente enlaces fosfodiéster (Agrawal et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:1401-1405; US Patent Publication No. 20010049436). A través de la investigación sobre oligonucleótidos, se ha reconocido que estas moléculas son susceptibles *in vivo* a la degradación por parte de exonucleasas, sucediendo la degradación primaria desde el extremo 3' de la molécula (Shaw et. al (1991) Nucleic Acids Res. 19:747-750; Tamsamani et al. (1993) Analytical Bioc. 215:54-58). Como tales, las metodologías para evitar esta actividad exonucleasa han utilizado (i) estructuras protectoras en los terminales 5' y/o 3' (Tesamani et. al (1992) Ann. NY Acad. Sci. 660:318-320; Tamsamani et al. (1993) Antisense Res. Dev. 3:277-284; Tang et al. (1993) Nucl. Acids Res. 20:2729-2735), (ii) enlazamiento de dos o más oligonucleótidos a través de enlaces 5'-3', 5'-2, 2'-3', 3'-2' o 3'-3' entre las moléculas (Agrawal et al. US 6,489,464), (iii) oligonucleótidos autohibridantes que se pliegan sobre sí mismos en el extremo 3', lo cual crea una horquilla y elimina el punto de acceso para la actividad de la 3'-exonucleasa al inicio (Tang et al. (1993) Nucl. Acids Res. 20:2729-2735), o (iv) incorporar ARN en la molécula de oligonucleótido, creando así una molécula híbrida ARN/ADN (Metelev et al. (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:2929-2934; Metelev US 5,652,355; Metelev & Agrawal US 6,143,881; Metelev & Agrawal US 6,346,614; Metelev & Agrawal US 6,683,167, Metelev & Agrawal US 7,045,609).

Otras metodologías para mejorar la estabilidad y retener la especificidad y actividad biológica de los oligonucleótidos antisentido utilizaron oligonucleótidos de polipirimidina formadores de tríplex que se enlazan a objetivos de ADN o ARN de cadena doble. Los oligonucleótidos de polipirimidina pueden enlazarse a ADN dúplex en el surco principal a través de puentes de hidrógeno Hoogsteen y formar estructuras tríplex que contienen una cadena polipurina y dos polipirimidina con tripletes de base T:A-T y C:G-C⁺ (Moser, H.E. and Dervan, P.B. (1987) Science 238, 645-650; Cooney, et al (1988) Science 241, 456-459). Los tríplex intramoleculares también se forman cuando las cadenas de homopurina y homopirimidina del ADN se funden y repliegan (Vasquez, K.M. and Wilson, J. H. (1998) Trends Bioche. Sci. 23, 4-9). La presencia de una tercera cadena introduce restricciones severas en la flexibilidad del ADN, cambiando su capacidad para reconocer proteínas específicas a lo largo del surco principal (Shields, G.C., et al. (1997) Am. Chem. Soc., 119, 7463 -7469; Jiménez-García, E., et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 24640-24648, dando como resultado una inhibición de la transcripción y finalmente una expresión genética reducida. Los oligonucleótidos que pueden enlazarse específicamente a una secuencia en ADN o ARN de cadena doble pueden actuar como reguladores de

transcripción/traducción y ofrecen una estrategia antígeno/antisentido prometedora para controlar la regulación de la expresión genética (Giovannangeli, C. and Helene, C. (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 413; Giovannangeli, C., et al. (1996) *Biochemistry* 35, 10539; Maher, L.J., et al. (1992) *Biochemistry* 31, 70). Sin embargo, las condiciones para formar tríplex estables son problemáticas debido al limitado reconocimiento de bases y a las condiciones de pH ácidas no fisiológicas requeridas para la protonación de las citosinas en los oligonucleótidos que forman tríplex.

En un intento para formar tales tríplex estables, se han descrito oligonucleótidos de polipirimidina con polaridad invertida y enlazados a través de un enlazante (esto es, una secuencia que tiene polaridad 5'→3' seguida por otra secuencia con polaridad 3'→5', o viceversa) (Froehler, US 5,399,676; Froehler US 5,527,899; Froehler US 5,721,218). En tales oligonucleótidos con polaridad invertida, la secuencia en un lado de la inversión se enlaza a una cadena de polipurina de un dúplex de acuerdo con el código de hélice triple y la secuencia sobre el otro lado que se enlaza al sitio de polipurina localizado de manera adyacente en la cadena opuesta del dúplex (diagrama 1A). De esta forma el reconocimiento de hélice triple puede ser extendido conmutando el reconocimiento de una cadena del dúplex a la otra y luego de regreso de nuevo, si se desea y tal estiramiento de la secuencia objetivo está disponible. Además, estos oligonucleótidos también pueden formar bucles D con el dúplex como se muestra en el diagrama 1B. En esta situación, la región de la primera polaridad puede formar tríplex, mientras que la porción invertida desplaza una sección de una cadena del dúplex para dar como resultado un dúplex sustituto en la región relevante. Puesto que los oligonucleótidos conmutados son capaces de actividad de enlazamiento en dúplex significativa, estos oligonucleótidos pueden ser útiles para inactivar la enfermedad que produce un ADN o un ARN indeseables que están en forma dúplex. Sin embargo, la composición de las moléculas está limitada a secuencias de polipirimidina que apuntan a sitios de polipurina del ARN o ADN de doble cadena.

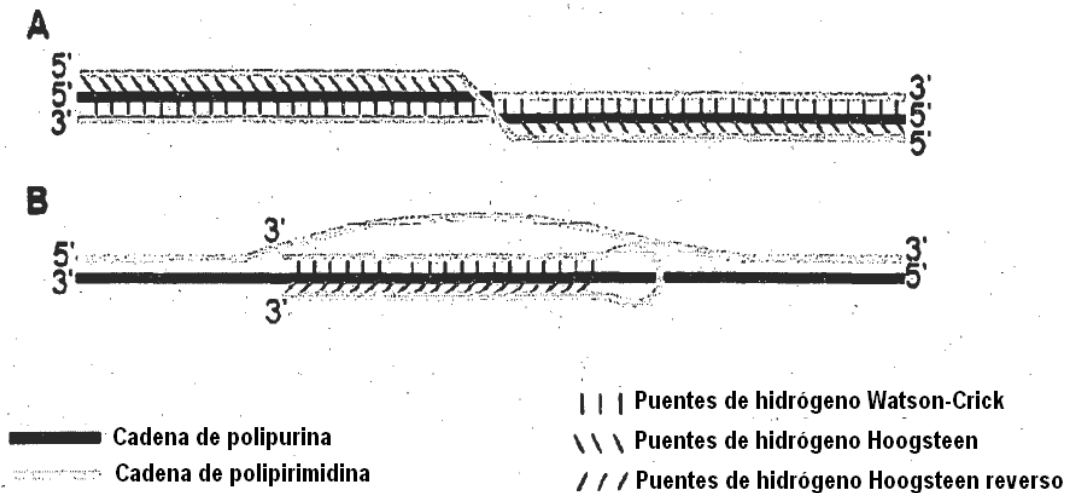


Diagrama 1. Modos de conmutación en formación de tríplex (A) y bucle D (B) de oligonucleótidos de enlazamiento con polaridad invertida

Alternativamente, se han desarrollado estrategias para apuntar a ADN y ARN de cadena sencilla mediante la formación de hélice triple. Una de las metodologías es apuntar a las cadenas sencillas de ADN o ARN de polipirimidina con oligonucleótidos formadores de tríplex de retropliegue con polaridad invertida (Kandimalla, E.R., et al. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6416-6417; Kandimalla, E.R., and Agrawal, S. (1996) *Biochemistry* 35, 15332). En tales oligonucleótidos formadores de tríplex de retropliegamiento, un oligonucleótido de polipirimidina y su cadena de polipurina complementaria se unen a través de enlace 3'-3' o enlace 5'-5'. Tales oligonucleótidos, que contienen secuencias complementarias unidas a través de enlaces 3'-3' o 5'-5' forman dúplex de cadenas paralelas a través de apareamiento de bases Hoogsteen o Hoogsteen reverso. Cuando está disponible una cadena de polipirimidina complementaria, forman estructuras helicoidales triples (Diagrama 2).

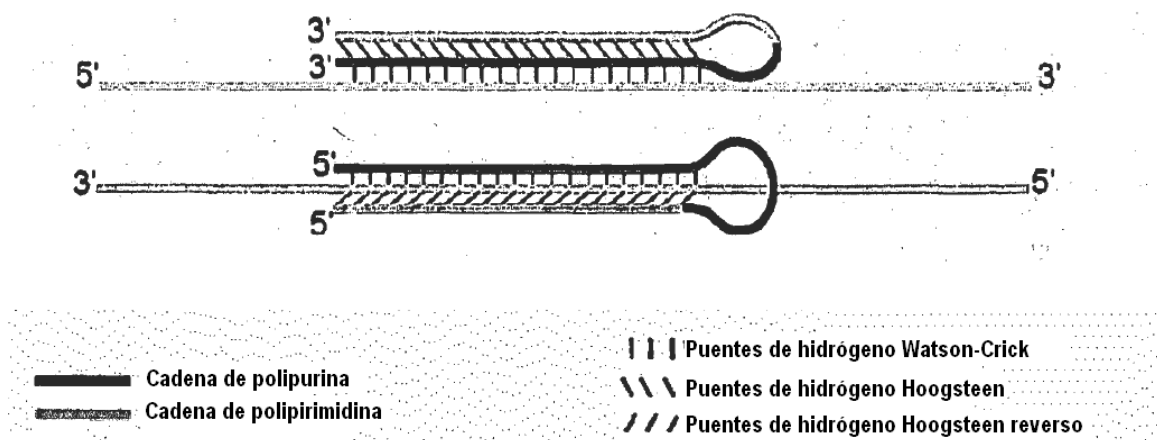


Diagrama 2. Modos de horquilla de cadenas paralelas de oligonucleótidos que contienen cadenas purina-pirimidina enlazadas por vía covalente en cualquiera de los extremos 3'-3' o 5'-5'.

La WO 2009/023819 A2 divulga antagonistas de oligonucleótidos del receptor 9 similar a Toll (TLR9). La WO 00/58330 A2 divulga oligonucleótidos seudocíclicos que comprenden un

oligonucleótido funcional y un oligonucleótido protector el cual es complementario al extremo terminal 3' o 5' del oligonucleótido funcional.

A pesar de los esfuerzos considerables, los esfuerzos para mejorar la estabilidad y mantener el reconocimiento de objetivos, sin efectos fuera del objetivo no han producido en general oligonucleótidos que puedan ser percibidos con utilidad clínica. Así, las tecnologías existentes basadas en antisentido dejan abierto el reto de crear compuestos que sean biológicamente estables, específicos para sus objetivos e inhibidores eficientes de la expresión genética. Se requieren por lo tanto nuevas metodologías.

Breve resumen de la invención

El alcance de la presente invención está definido en las reivindicaciones anexas. También se divulgan compuestos, composiciones y métodos útiles para modular la expresión genética utilizando compuestos basados en oligonucleótidos que comprenden dos o más oligonucleótidos antisentido de cadena sencilla que están enlazados a través de sus extremos 5' para permitir la presencia de dos o más extremos 3' accesibles, los cuales inhiben o hacen disminuir efectivamente la expresión genética. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que tales compuestos de oligonucleótidos son más efectivos que los oligonucleótidos antisentido no enlazados.

Se divulgan, en un primer aspecto, novedosos compuestos sintéticos basados en oligonucleótidos que comprenden dos o más oligonucleótidos que son complementarios a una o más secuencias de ARNm, en donde los oligonucleótidos están enlazados a través de sus extremos 5' para permitir la presencia de dos o más extremos 3' accesibles, y que hibridizan específicamente e inhiben la expresión de la una o más secuencias de ARNm.

También se divulgan, en un segundo aspecto, composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender cualquier compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto en un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

También se divulga, en un tercer aspecto, un método para inhibir la expresión genética, comprendiendo el método en poner en contacto una célula con un compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto.

También se divulga, en un cuarto aspecto, un método para inhibir la expresión genética en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero el compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto.

También se divulga, en un quinto aspecto, que la invención provee un método para inhibir respuestas mediadas por TLR, mediadas por Bcl-2, mediadas por EGFR, mediadas por mdm2, mediadas por MyD88, mediadas por PCSK9, mediadas por survivina o mediadas por VEGF en un mamífero a través de la administración de un compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto, en donde los oligonucleótidos son complementarios a una o más secuencias de ARNm de TLR, Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF.

5 También se divulga, en un sexto aspecto, un método para inhibir una respuesta mediada por TLR, mediada por Bcl-2, mediada por EGFR, mediada por mdm2, mediada por MyD88, mediada por PCSK9, mediada por survivina o mediada por VEGF en un mamífero a través de la administración de un compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto, en donde los oligonucleótidos son complementarios a una o más de secuencias de ARNm de TLR, Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF en combinación con un antagonista de la actividad proteínica de TLR, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF.

10 También se divulgan, en un séptimo aspecto, métodos para inhibir la expresión genética en un mamífero, comprendiendo tales métodos la administración al mamífero de un compuesto basado en oligonucleótidos divulgado aquí. En algunas realizaciones, el mamífero es un humano, en algunas realizaciones preferidas, el compuesto basado en oligonucleótidos es administrado a un mamífero que requiere inhibir su respuesta inmune.

15 También se divulgan aquí, en un octavo aspecto, métodos para tratar terapéuticamente un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, comprendiendo tales métodos la administración al paciente de un compuesto basado en oligonucleótidos divulgado aquí en una cantidad terapéuticamente efectiva. En diversas realizaciones, la enfermedad o trastorno que va a ser tratado es cáncer, un trastorno autoinmune, enfermedad infecciosa, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen, sin limitación, bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

20 También se divulgan aquí, en un noveno aspecto, métodos para evitar una enfermedad o trastorno, comprendiendo tales métodos administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno un compuesto basado en oligonucleótidos divulgado aquí en una cantidad farmacéuticamente efectiva. En diversas realizaciones, la enfermedad o trastorno que se va a prevenir es cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen, sin limitación, bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

25 También se divulga, en un décimo aspecto, un método para prevenir o tratar un trastorno, comprendiendo tal método aislar células capaces de producir citoquinas o quimioquinas que incluyen, pero no se limitan a, células inmunes, células reguladoras T, células B, células PBMC, pDC y linfoides; el cultivo de tales células bajo condiciones de cultivos celular estándar, tratamiento de tales células ex vivo con un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de tal manera que las células aisladas producen o secretan niveles disminuidos de citoquinas o quimioquinas, y administrar o readministrar las células tratadas a un paciente que requiere de terapia para inhibir la citoquinas y/o las quimioquinas para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad. Este aspecto estaría de acuerdo con técnicas de inmunoterapia celular de adopción estándar para producir células inmunes activadas.

30 También se divulga, en un décimo primer aspecto, una composición que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto y una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos (tanto de quimioterapia tradicional como las terapias direccionadas modernas), inhibidores de quinasa, alérgenos, antibióticos, agonistas, antagonistas, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de ARNi, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNm, aptámeros, proteínas, vectores para terapia de genes, vacunas de ADN, adyuvantes, moléculas coestimuladores o combinaciones de las mismas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es un esquema sintético para la síntesis lineal de oligonucleótidos antisentido de la invención. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

40 La figura 1B es un esquema sintético para la síntesis en paralelo de oligonucleótidos antisentido de la invención. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

45 Las figuras 2A y 2B representan la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en células HEK293 que expresan TLR9 murínico. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la actividad agonista de TLR9 en células cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

La figura 2C representa la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en células HEK293 que expresan TLR7 murínico. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la actividad agonista de TLR7 en células cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

50 La figura 2D representa la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en células HEK293 que expresan MyD88 murínico. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la actividad agonista de MyD88 en células cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

La figura 3 representa la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en esplenocitos de ratón. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la traducción de ARNm de TLR9, o síntesis de proteínas, en esplenocitos tratados de acuerdo con el Ejemplo 2.

5 La figura 4 representa la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en PBMCs humano. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la traducción de ARNm de TLR9, o síntesis de proteínas, en PBMCs humano tratado de acuerdo con el Ejemplo 2.

10 Las figuras 5A y 5B representan la actividad de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención para inhibir IL-12 inducido por TLR9 después de la administración *in vivo* de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración de un oligonucleótido antisentido de TLR9 de ejemplo de acuerdo con la invención puede producir una subregulación de la expresión de TLR9 *in vivo* y evitar la inducción de IL-12 por un agonista de TLR9. Más en general, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido antisentido de TLR9 de acuerdo con la invención para inhibir la inducción de citoquinas proinflamatorias por un agonista de TLR9.

15 La figura 5C representa la duración de la actividad *in vivo* de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención para inhibir IL-12 inducido por MyD88 después de la administración *in vivo* de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración de un oligonucleótido antisentido de MyD88 de ejemplo de acuerdo con la invención puede producir la subregulación de la expresión de MyD88 y evitar la inducción de IL-12 por un agonista de TLR9 para una duración mayor que los oligonucleótidos antisentido lineales o los oligonucleótidos antisentido enlazados en 3'-3'. De manera más general, los datos demuestran la capacidad del oligonucleótido antisentido de MyD88 de acuerdo con la invención para inhibir la inducción de citoquinas proinflamatorias por un agonista de TLR.

20 La figura 6 representa la capacidad de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención para inhibir IL-12 inducido por TLR9 en una forma dependiente de la dosis después de administración *in vivo* de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración *in vivo* de un oligonucleótido antisentido de TLR9 de acuerdo con la invención pueden producir subregulación de la expresión de TLR9 *in vivo* en una forma dependiente de la dosis y evitar la inducción de IL-12 por un agonista de TLR9. De manera más general, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido antisentido de TLR9 de acuerdo con la invención para inhibir selectivamente la inducción de citoquinas proinflamatorias por un agonista de TLR9.

25 La figura 7 representa la actividad de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención para inhibir IL-12 inducido por TLR9 en una forma dependiente del tiempo después de la administración *in vivo* de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración *in vivo* de un oligonucleótido antisentido de TLR9 de acuerdo con la invención puede producir subregulación de la expresión de TLR9 *in vivo* en una forma dependiente del tiempo y evitar la inducción de IL-12 por un agonista de TLR9 por un período extendido de tiempo. De manera más general, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido antisentido de TLR9 de acuerdo con la invención para inhibir la inducción de citoquinas proinflamatorias por un agonista de TLR9 en una forma dependiente del tiempo.

30 Las figuras 8A, 8B, 8C representan la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en células murínicas J774. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la transcripción, traducción de ARNm de TLR9, o la síntesis de proteína, en células murínicas J774 tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

35 La figura 8D representan la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en células HeLa humanas. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la transcripción de ARNm VEGF en células HeLa humanas tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

La figura 9 representa la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en células B humanas. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la traducción de ARNm de TLR9, o síntesis de proteína, en células B humanas tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

40 La figura 10 representa la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en pDCs humano. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la traducción de ARNm de TLR9, o la síntesis de proteína, en pDCs humano tratado de acuerdo con el Ejemplo 2.

45 La figura 11 representa la actividad de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención para inhibir IL-12 inducido por TLR9 después de la administración *in vivo* de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración *in vivo* de un oligonucleótido antisentido de TLR9 de ejemplo de acuerdo con la invención puede producir

la subregulación de la expresión de TLR9 *in vivo* y evitar la inducción de IL-12 por un agonista de TLR9. Más en general, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido antisentido de TLR9 de acuerdo con la invención para inhibir la inducción de citoquinas proinflamatorias en un agonista de TLR9.

5 La figura 12 representa la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención en células HEK293 que expresan TLR7 de ratón. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir la actividad agonista de TLR7 en células cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

10 La figura 13 representa el enlazamiento y escisión selectivos de oligonucleótidos antisentido de ejemplo de acuerdo con la invención tratados de acuerdo con el ejemplo 4. En la figura 13, la línea 1 es substrato solo; la línea 2 es nucleasa T1; la línea 3 es 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3' (SEQ ID NO. 28); la línea 4 es 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-X-CCUGACGUGUCUGUUCGUA-5'; la línea 5 es 3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC3' (SEQ ID 21); la línea 6 es 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3'; la línea 7 es 5'-CUGUCoAoAoAoUoGoCoUoUoGoUoCoUoUoGoCoAoGoUoCoCoACGAU-3' (SEQ ID NO. 29); la línea 8 es ARNds; 15 y la línea 9 es ADN antisentido 20-mero; en donde todas las secuencias tienen esqueleto de fosforotioato excepto cuando se indica con una "o" (enlace fosfodiéster); los nucleótidos subrayados indican 2'-O-metilribonucleótidos. Los datos demuestran que los oligonucleótidos de acuerdo con la invención proveen una estructura óptima para enlazamiento y escisión por proteínas y enzimas asociadas con la inhibición mediada por ARNi de la expresión genética.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 La invención se relaciona con el uso terapéutico y profiláctico de oligonucleótidos antisentido novedosos para subregular la expresión genética. Tales moléculas son útiles, por ejemplo, en proveer composiciones para la modulación de expresión genética o para tratar y/o evitar enfermedades y/o condiciones que son capaces de responder a la modulación de la expresión genética en pacientes, sujetos, animales u organismos.

25 Las patentes y publicaciones citadas aquí reflejan el nivel de conocimiento en el arte. Cualquier conflicto entre las enseñanzas de estas patentes y publicaciones y esta especificación será resuelto en favor de esta última.

Los objetivos de la presente invención, las diversas características de las mismas, así como la invención en sí misma pueden ser entendidos más completamente a partir de la siguiente descripción, cuando se lee junto con los dibujos acompañantes en los cuales los siguientes términos tienen los significados adscritos.

30 El término "2'-O- sustituido" significa la sustitución de la posición 2' de la unidad estructural pentosa con un -O- grupo alquilo inferior que contienen 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados (por ejemplo, pero no limitándose a, 2'-O-metil), o con un grupo -O- arilo o alilo que tiene 2-6 átomos de carbono, en donde tal grupo alquilo, arilo o alilo puede ser no sustituido o puede ser sustituido (por ejemplo, con grupos 2'-O-metoxietilo, etoxi, metoxi, halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carbalcoxilo, o amino); o con un grupo hidroxilo, amino o halo, pero no con un grupo 2'-H. En algunas realizaciones los oligonucleótidos de la invención incluyen cuatro o cinco 35 nucleótidos 2'-O-alquilo en su terminal 5', y/o cuatro o cinco nucleótidos 2'-O-alquilo en su terminal 3'.

El término "3' ", cuando se usa direccionalmente, se refiere en general a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 3' (hacia el extremo 3' del nucleótido) desde otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.

40 El término "extremo 3'" se refiere en general al nucleótido terminal en 3' de los oligonucleótidos componentes. "Dos o más oligonucleótidos enlazados en sus extremos 3' " se refiere en general a un enlace entre los nucleótidos 3' terminales de los oligonucleótidos que pueden ser directamente a través de los grupos 5', 3' o 2' hidroxilo, o indirectamente, a través de un enlazante no nucleótido. Tales enlaces también pueden ser vía nucleósido, utilizando las posiciones 2' y 3' hidroxilo del nucleósido. Tales enlaces también pueden utilizar un azúcar o nucleobase funcionalizados de un nucleótido 3' terminal.

45 El término "5' ", cuando se usa direccionalmente, se refiere en general a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 5' (hacia el extremo 5' del nucleótido) desde otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.

50 El término "extremo 5' " se refiere en general al nucleótido terminal 5' de los oligonucleótidos componentes. "Dos o más oligonucleótidos antisentido de cadena sencilla enlazados en sus extremos 5' " se refieren en general a un enlace entre los nucleótidos terminales 5' de los oligonucleótidos que pueden ser directamente a través de grupos 5', 3' o 2', o indirectamente, a través de un enlazante no nucleótido. Tales enlaces también pueden ser a través de un nucleósido utilizando ambas posiciones 2' y 3' hidroxilo del nucleósido. Tales enlaces también pueden utilizar un azúcar o nucleobase funcionalizados de un nucleótido 5' terminal.

- El término “aproximadamente” significa en general que el número exacto no es crítico. Así, los oligonucleótidos que tienen uno o dos residuos de nucleósido menos, o de uno a varios residuos de nucleósidos adicionales son contemplados como equivalentes de cada una de las realizaciones descritas más arriba.
- 5 El término “accesible” significa en general cuando se relaciona con un compuesto de acuerdo con la invención, que la porción relevante de las moléculas es capaz de ser reconocida por los componentes celulares necesarios para disparar una respuesta pretendida al compuesto.
- El término “agonista” se refiere generalmente a una sustancia que se enlaza a un receptor de una célula e induce una respuesta. Un agonista frecuentemente imita la acción de una sustancia de origen natural tal como un ligando.
- El término “antagonista” se refiere en general a una sustancia que atenúa los efectos de un agonista o ligando.
- 10 El término “inflamación de las vías respiratorias” incluye en general, sin limitación, la inflamación del tracto respiratorio causada por alérgenos, incluyendo asma.
- El término “alérgeno” se refiere en general a un antígeno o porción antigénica de una molécula, usualmente una proteína, la cual dispara una respuesta alérgica por exposición a un sujeto. Típicamente el sujeto es alérgico al alérgeno como se indica, por ejemplo, mediante la prueba por el método de la inflamación y brillo o cualquier método conocido en la técnica. Se dice que una molécula es un alérgeno incluso si solo un pequeño subconjunto de sujetos exhibe una respuesta alérgica inmune (por ejemplo, IgE), por exposición a la molécula.
- 15 El término “alergias” incluye en general, sin limitación, alergias a alimentos, alergias respiratorias y alergias de la piel.
- El término “antígeno” se refiere en general a una sustancia que es reconocida y enlazada selectivamente por un anticuerpo o por un receptor de antígenos de células T. Los antígenos pueden incluir pero no están limitados a péptidos, proteínas, lípidos, carbohidratos, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Los antígenos pueden ser naturales o sintéticos y en general inducen una respuesta inmune que es específica para ese antígeno.
- 20 El término “trastorno autoinmune” se refiere en general a trastornos en los cuales el antígeno “mismo” sufre ataque por parte del sistema inmune. Tal término incluye, sin limitación, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, síndrome de intestino irritable, enfermedad de Chron, artritis reumatoide, choque séptico, alopecia universalis, encefalomiелitis aguda diseminada, enfermedad de Addison, enpondilitis anquilosantes, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, bulus penfigoide, enfermedad de chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad hidrox, dermatomiositis, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain Barré, enfermedad de Hashimoto, hidradentitis supurativa,
- 25 30 purpura idiopática trombocitopénica, cistitis intersticial, morfea, miastenia gravis, narcolepsia, neuromiotonia, pemfigus, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, esquizofrenia, síndrome de Sjögren, arteritis temporal (“arteritis de células gigantes”), vasculitis, vitíligo, vulvodinia y granulomatosis de Wegener, asma autoinmune, choque séptico y psoriasis.
- El término “inestabilidad biológica” se refiere en general a la capacidad de una molécula para hacer degradada y subsecuentemente inactivadas *in vivo*. Para los oligonucleótidos, tal degradación es el resultado de una actividad de exonucleasas y/o actividad de endonucleasas, en donde la actividad de exonucleasas se refiere a nucleótidos de escisión del extremo 3' o 5' de un oligonucleótido, y actividad de endonucleasas se refiere a la escisión de enlaces fosfodiéster en posiciones diferentes a los extremos del oligonucleótido.
- 35 El término “cáncer” se refiere en general, sin limitación, a cualquier crecimiento o tumor maligno causado por proliferación y/o división anormal o no controlada de células. Los cánceres pueden presentarse en humanos y/o mamíferos y pueden surgir en cualquiera y en todos los tejidos. El tratamiento de un paciente que tiene cáncer puede incluir la administración de un compuesto, formulación farmacéutica o vacuna de acuerdo con la invención de tal manera que la proliferación y/o división anormal o incontrolada, o metástasis son afectadas.
- 40 El término “vehículo” abarca en general cualquier excipiente, diluyente, agente de relleno, sal, regulador, estabilizador, solubilizador, aceite, lípido, vesícula con contenido de lípido, microesferas, encapsulación liposómica, u otro material para uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del vehículo, excipiente o diluyente dependerán de la ruta de administración para una aplicación particular. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales está descrita, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co. Easton, PA, 1990.
- 45 El término “coadministración” o “coadministrado” se refiere en general a la administración de al menos dos sustancias suficientemente cercanas en tiempo para modular una respuesta inmune. La coadministración se refiere a administración
- 50

simultánea, así como a un orden espaciado en el tiempo de hasta siete días de separación, de al menos dos sustancias diferentes en cualquier orden, bien sea en una dosis individual o en dosis separadas.

El término “en combinación con” significa en general administrar un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención y otro agente útil para el tratamiento de la enfermedad o condición que no anula la actividad del compuesto en el transcurso del tratamiento de un paciente. Tal administración puede hacerse en cualquier orden, incluyendo administración simultánea, así como en un orden espaciado en el tiempo desde unos pocos segundos hasta varios días de separación. Tal tratamiento en combinación también puede incluir más de una administración individual del compuesto de acuerdo con la invención y/o independientemente del otro agente. La administración del compuesto de acuerdo con la invención y del otro agente puede ser por la misma o por diferentes rutas.

El término “individuo” o “sujeto” o “paciente” se refiere en general a un mamífero, tal como un humano.

El término “inhibidor de quinasa” se refiere en general a moléculas que antagonizan o inhiben las rutas de señalización y/o crecimiento celular dependiente de la fosforilación en una célula. Los inhibidores de quinasa pueden ser de origen natural o sintéticos y pueden incluir moléculas pequeñas que tienen el potencial de ser administradas como agentes terapéuticos orales. Los inhibidores de quinasa tienen la capacidad de inhibir rápida y específicamente la activación de las moléculas de quinasa objetivo. Las proteínas quinasas son fármacos objetivo atractivos, en parte porque regulan una amplia variedad de rutas de señalización y crecimiento e incluyen muchas diferentes proteínas. Como tales, tienen un gran potencial en el tratamiento de enfermedades que involucran la señalización de quinasa, incluyendo cáncer, enfermedad cardiovascular, trastornos inflamatorios, diabetes, degeneración macular y trastornos neurológicos. Un ejemplo no limitante de un inhibidor de quinasa es el sorafenib.

El término “síntesis lineal” se refiere en general a una síntesis que comienza en un extremo de un oligonucleótido y progresa linealmente hasta el otro extremo. La síntesis lineal permite la incorporación de unidades monoméricas bien sea idénticas o no idénticas (en términos de longitud, composición de bases y/o modificaciones químicas incorporadas) en un oligonucleótido.

El término “mamífero” esta previsto expresamente para incluir animales vertebrados de sangre caliente, incluyendo, sin limitación, humanos, primates no humanos, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado, vacas, cerdos, ovejas y conejos.

El término “nucleósido” se refiere en general a compuestos que consisten de un azúcar, usualmente ribosa, desoxirribosa, pentosa, arabinosa o hexosa, y una base purínica o pirimidínica.

El término “nucleótidos” se refiere en general a un nucleósido que comprende un grupo que contiene fósforo unido al azúcar.

El término “nucleósido modificado” o “derivado de nucleótido” es en general un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, una unidad estructural azúcar modificada, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el nucleósido o derivado de nucleótido es un nucleósido de pirimidina o purina no natural, como se describe aquí. Para propósitos de la invención, un nucleósido o derivado de nucleótido modificado, un análogo de pirimidina o purina o una pirimidina o purina de origen no natural puede ser utilizado de manera intercambiable y se refiere a un nucleósido que incluye una base de origen no natural y/o una unidad estructural azúcar de origen no natural. Para propósitos de la invención, una base se considera como no natural si no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y un azúcar se considera como no natural si no es β -ribofuranósido o 2'-desoxirribofuranósido.

El término “oligonucleótido modificado” tal como se utiliza aquí describe un oligonucleótido en el cual al menos dos de sus nucleótidos están enlazados covalentemente a través de un enlace sintético, esto es, un enlace diferente a un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido en el cual el fosfato de nucleótido en 5' ha sido reemplazado con cualquier número de grupos químicos. El término “oligonucleótido modificado” también abarca ácidos 2'-O,4'-C-metilen-b-D-ribofuranosil nucleicos, ácidos nucleicos de arabinosa, ácidos nucleicos de arabinosa sustituidos, ácidos nucleicos de hexosa, ácidos nucleicos peptídicos, morfolino y oligonucleótidos que tienen al menos un nucleótido con una base y/o azúcar modificada, tal como un ribonucleótido 2'-O- sustituido, 5-metilcitosina y/o 3'-O- sustituido.

El término “ácido nucleico” abarca una región genómica o una molécula de ARN transcrita desde la misma. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un ARNm.

El término “enlazante” se refiere en general a una unidad estructural que puede ser unida a un oligonucleótido por medio de un enlace covalente o no covalente a través de un azúcar, una base o del esqueleto. El enlace no covalente puede ser, sin limitación, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento π , enlaces de hidrógeno y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de tales enlaces no covalentes incluyen apareamiento de bases según Watson-Crick, apareamiento de bases según Hoogsteen, y apareamiento de bases. El enlazante puede

ser utilizado para enlazar dos o más nucleósidos o puede estar unido al nucleósido 5' y/o 3' terminal en el oligonucleósido. Tal enlazante puede ser un enlazante no nucleótido o un enlazante nucleósido.

El término "enlazante no nucleótido" se refiere en general a una unidad estructural química, diferente a un enlace directamente entre dos nucleótidos que puede ser unido a un oligonucleótido por medio de un enlace covalente o no covalente. Preferiblemente tal enlace no nucleótido tiene desde aproximadamente 2 angstroms hasta aproximadamente 200 angstroms de longitud, y puede estar bien en una orientación cis o trans.

El término "enlace internucleótidos" se refiere en general a un enlace químico para unir dos nucleótidos a través de sus azúcares (por ejemplo, 3'-3', 2'-3', 2'-5', 3'-5', 5'-5') que consiste de un átomo de fósforo y un grupo cargado o neutro (por ejemplo fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato y metilfosfonato) entre nucleósidos adyacentes.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleósido formado a partir de una pluralidad de unidades de nucleósido enlazadas, las cuales pueden incluir, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, nucleótidos sintéticos o naturales, enlaces fosfodiéster o modificados, bases naturales o bases modificadas, azúcares naturales o azúcares modificados, o combinaciones de estos componentes. Las unidades nucleósido pueden ser parte de virus, bacterias, residuos celulares o composiciones basadas en oligonucleótidos (por ejemplo ARNs y microARN). Tales oligonucleótidos también pueden ser obtenidos a partir de fuentes de ácidos nucleicos existentes, incluyendo genómicas o ADNc, pero preferiblemente son producidos por métodos sintéticos. En ciertas realizaciones cada unidad nucleósido incluye una base heterocíclica y un pentafuranosilo, trealosa, arabinosa, nucleósido de 2'-desoxi-2'-sustituida, arabinosa sustituida con 2'-desoxi-2', 2'-O-arabinosa sustituida o grupo de azúcar hexosa. Los residuos de nucleósidos pueden ser acoplados uno a otro por cualquiera de los numerosos enlaces internucleósido conocidos. Tales enlaces internucleósido incluyen, sin limitación, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato con puente, fosfonato de metileno con puente, fosforotioato con puente e internucleósidos sulfona. El término "oligonucleótido" también abarca polinucleósidos que tienen uno o más enlaces internucleósidos estereoespecíficos por ejemplo, (R_p)- o (S_p)- fosforotioato, alquilfosfonato o enlaces fosfotriéster). Tal como se utilizan aquí, los términos "oligonucleótidos" y "dinucleótidos" están previstos expresamente para incluir polinucleósidos y dinucleósidos que tienen cualquiera de tales enlaces internucleósidos, bien comprenda o no el enlace un grupo fosfato. En ciertas realizaciones de ejemplo, estos enlaces internucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato, o combinaciones de los mismos. En realizaciones de ejemplo, los nucleótidos de los oligonucleótidos sintéticos están enlazados con al menos un enlace internucleótido de fosforotioato. Los enlaces de fosforotioato pueden ser enantiómeros R_p y S_p mezclados, o pueden ser estereorregulares o sustancialmente estereorregulares en forma R_p o bien S_p (véase Iyer et al (1995) Tetrahedron Asymmetry 6:1051-1054). En ciertas realizaciones, uno o más de los oligonucleótidos dentro de las composiciones antisentido de la invención comprenden uno o más de ácido 2'-O,4'-C-metilen-b-D-ribofuranosilo nucleico, en donde la ribosa es modificada con un enlace entre los carbonos 2' y 4', el cual fija la ribosa en la conformación estructural 3'-endo.

La expresión "un oligonucleótido que es complementario a una secuencia de ARN de cadena sencilla" y similares, significa que el oligonucleótido forma un número suficiente de puentes de hidrógeno a través de interacciones Watson-Crick de sus nucleobases con nucleobases de la secuencia de ARN de cadena sencilla para formar una doble hélice con la secuencia de ARN individual encadenada bajo condiciones fisiológicas. Esto va en contraste de los oligonucleótidos que forman una hélice triple con un ADN o ARN de cadena doble a través de puentes de hidrógeno según Hoogsteen.

El término "complementario" pretende indicar un oligonucleótido que se enlaza a las secuencias de ácidos nucleicos bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, mediante el apareamiento de bases de Watson-Crick (interacción entre oligonucleótidos y ácidos nucleicos de cadena sencilla) o por el apareamiento de bases de Hoogsteen (interacción entre oligonucleótidos y ácidos nucleicos de doble cadena) o por cualquier otro medio, incluyendo en el caso de un oligonucleótido, el enlazamiento a ARN y la generación de la formación de pseudonudos. El enlazamiento por apareamiento de bases de Watson-Crick o Hoogsteen bajo condiciones fisiológicas se mide como un asunto práctico observando interferencia con la función de la secuencia de ácidos nucleicos.

El término "péptidos" se refiere en general a oligómeros o polímeros de aminoácidos que son de suficiente longitud y composición para afectar una respuesta biológica, por ejemplo, producción de anticuerpos o actividad de citoquina si el péptido es o no un hapteno. El término "péptido" puede incluir aminoácidos modificados (bien sea de origen natural o no natural), en donde tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a fosforilación, glicosilación, pegilación, lipidación y metilación.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de un compuesto de acuerdo con la invención o con la actividad biológica de un compuesto de acuerdo con la invención.

El término “fisiológicamente aceptable” se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, un cultivo celular, tejido u organismo. Preferiblemente, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un mamífero, particularmente un humano.

5 El término “cantidad profilácticamente efectiva” se refiere en general a una cantidad suficiente para evitar o reducir el desarrollo de un efecto biológico indeseado.

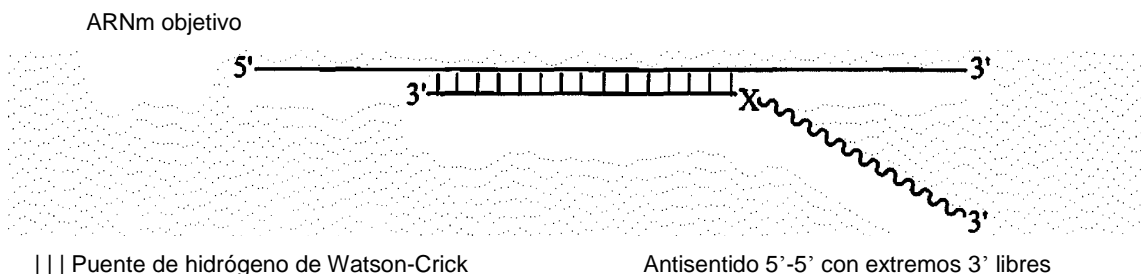
10 El término “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad farmacéuticamente efectiva” se refiere en general a una cantidad suficiente para afectar un efecto biológico deseado, tal como un resultado beneficioso, incluyendo, sin limitación, prevención, disminución, mejora o eliminación de signos o síntomas de una enfermedad o trastorno. Así, la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, pero no limitándose a, curación de condiciones crónicas caracterizadas por estimulación inmune. Así, una “cantidad farmacéuticamente efectiva” dependerá del contexto en el cual está siendo administrada. Una cantidad farmacéuticamente efectiva puede ser administrada en una o más administraciones profilácticas o terapéuticas. Cuando se aplica a un individuo el ingrediente activo, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, bien sea administrado en combinación, en forma seriada o simultáneamente.

El término “tratamiento” se refiere en general a una metodología prevista para obtener un beneficio o resultado deseado, el cual puede incluir alivio de los síntomas, o retardo o mejora de la progresión de una enfermedad.

20 El término “expresión genética” se refiere en general a un proceso mediante el cual se utiliza información de un gen en la síntesis de un producto genético funcional, el cual puede ser una proteína. El proceso puede involucrar transcripción, división de ARN, traducción y modificación postraducción de una proteína, y puede incluir ARNm, preARN, ARN ribosómico y otras plantillas para la síntesis de proteínas.

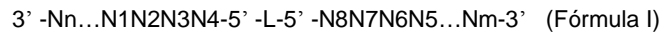
25 En un primer aspecto, la invención provee compuestos novedosos basados en oligonucleótidos que comprenden dos oligonucleótidos antisentido de cadena sencilla enlazados en sus extremos 5', en donde los compuestos tienen dos extremos 3' accesibles. El enlace en los extremos 5' de los oligonucleótidos componentes es independiente de los otros enlaces de oligonucleótidos y pueden ser directamente a través de grupos 5', 3' o 2' hidroxilo, o indirectamente, a través de un enlazador no nucleótido o un nucleótido, utilizando bien sea las posiciones 2' o 3' hidroxilo del nucleósido. Los enlaces pueden utilizar también un azúcar funcionalizada o una nucleobase de un nucleótido 5' terminal.

30 Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención comprenden dos secuencias idénticas o diferentes conjugadas en sus extremos 5'-5' a través de un fosfodiéster, fosforotioato o enlazador no nucleósido (Diagrama 3). Tales compuestos comprenden de 15 a 27 nucleótidos que son complementarios a porciones específicas de objetivos ARNm de interés para la subregulación antisentido del producto genético. Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención que comprenden secuencias idénticas son capaces de unirse a un ARNm específico a través de interacciones por puentes de hidrógeno de Watson-Crick e inhibir la expresión de proteína (Diagrama 3). Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención que comprenden diferentes secuencias son capaces de enlazarse a dos o más regiones diferentes de uno o más ARNm objetivo e inhibir la expresión de proteína. Tales compuestos están compuestos de secuencias de heteronucleótidos complementarias a ARNm objetivo y forman estructuras dúplex estables a través de puentes de hidrogeno de Watson-Crick. Sorprendentemente, tales secuencias que contienen dos extremos 3' libres (antisentido enlazado por 5'-5') son inhibidores más potentes de la expresión genética que los que contienen un extremo 3' libre o extremo 3' no libre.



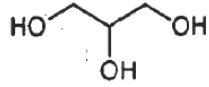
45 Diagrama 3. Modelo antisentido de enlazamiento de los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

- Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención son útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades en donde la inhibición de una expresión genética sería beneficiosa. Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos antisentido que comprenden nucleótidos de origen natural, nucleótidos modificados, oligonucleótidos modificados y/o oligonucleótidos modificados de esqueleto. Sin embargo, los oligonucleótidos antisentido que inhiben la traducción de proteínas codificadas por ARNm pueden producir efectos biológicos indeseados, incluyendo pero no limitándose a actividad antisentido insuficiente, biodisponibilidad inadecuada, farmacocinética o farmacodinámica subóptimas, estimulación inmune no buscada, actividad fuera del objetivo, e inestabilidad biológica. El diseño óptimo de un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención requiere muchas consideraciones más allá del simple diseño de una molécula que es complementaria a la secuencia de ARN objetivo. Así, la preparación de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención está prevista para incorporar cambios necesarios para limitar la interferencia de estructuras secundarias con la actividad antisentido, potenciar la especificidad al objetivo del oligonucleótido, minimizar la interacción con factores de enlazamiento o competición (por ejemplo, proteínas), optimizar el consumo celular, biodisponibilidad, farmacocinética y farmacodinámica, y/o inhibir, prevenir o suprimir activación de células inmune.
- La estructura general de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención puede ser descritas por la siguiente fórmula:

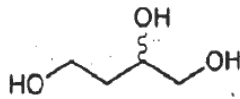


- En donde L es un enlazante nucleótido o un enlazante no nucleótido, N1-N8, en cada aparición, es independientemente un nucleótido o un derivado de un nucleótido; Nm y Nn, en cada aparición, son independientemente un nucleótido o un derivado de un nucleótido; y en donde m y n son independientemente números de 0 a aproximadamente 40. Enlazantes no nucleótidos representativos se presentan en la Tabla 1.

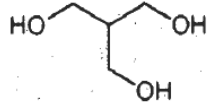
Tabla 1: Enlazantes no nucleótidos representativos



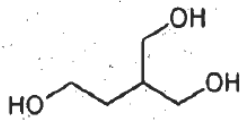
Glicerol (1,2,3-propanotriol)



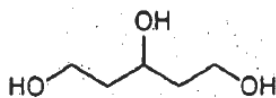
1,2,4-Butanotriol



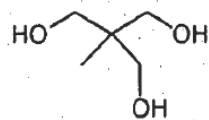
2-(Hidroximetil)-1,3-propanodiol



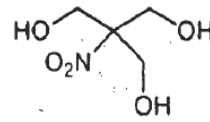
2-(hidroximetil)1,4-butanodiol



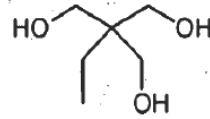
1,3,5-Pentanotriol



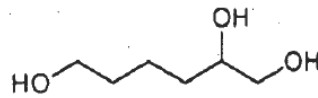
1,1,1-Tris(hidroximetil)etano



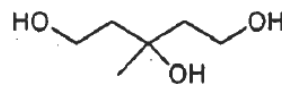
1,1,1-Tris (hidroximetil)nitrometano



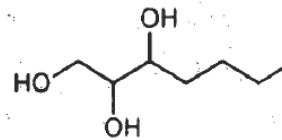
1,1,1-Tris (hidroximetil)propano



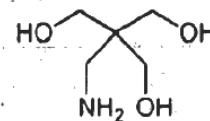
1,2,6-Hexanotriol



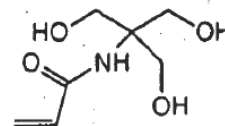
3-Metil-1,3,5-pentanotriol



1,2,3-Heptanotriol

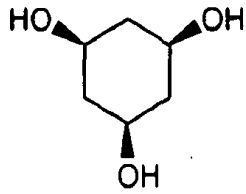


2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3 propanodiol

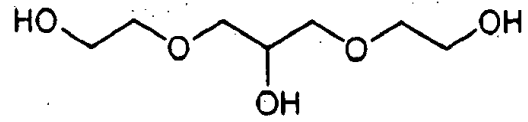


N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida

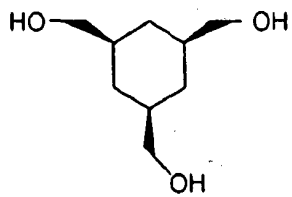
Tabla 1: continuación



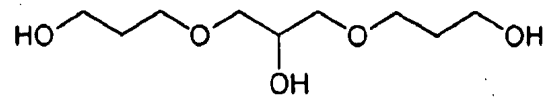
cis-1,3,5-Ciclohexanotriol



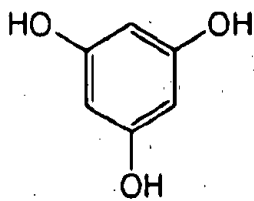
1,3-Di(hidroxi-etoxi)-2-hidroxi-propano



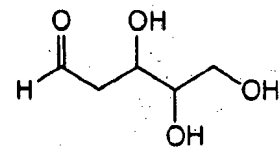
cis-1,3,5-Tri(hidroxi-metil)ciclohexano



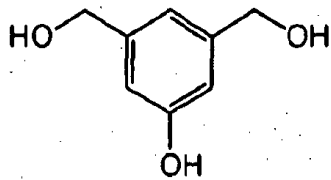
1,3-Di(hidroxi-propoxi)-2-hidroxi-propano



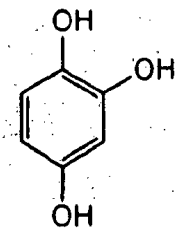
1,3,5-Trihidroxil-benceno



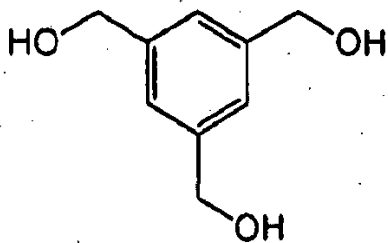
2-Desoxi-D-ribosa



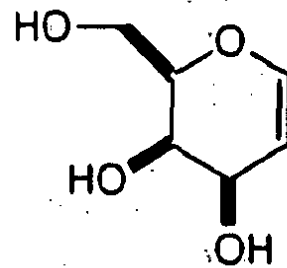
3,5-Di(hidroxi-metil)fenol



1,2,4,-Trihidroxil-benceno

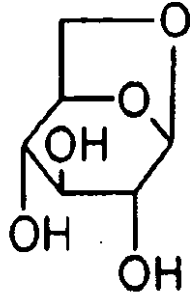


1,3,5-Tri(hidroxi-metil)benceno

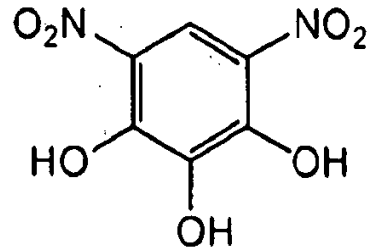


D-Galactool

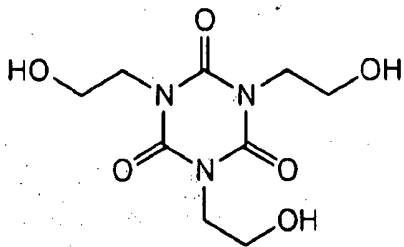
Tabla 1: Continuación



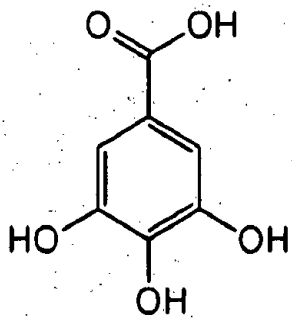
1,6-anhidro-β-D-Glucosa



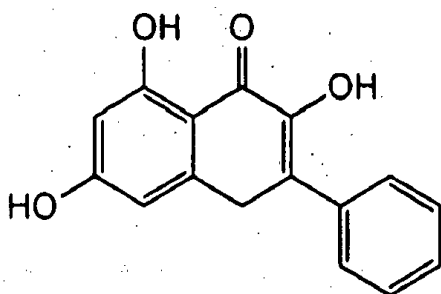
4,6-Nitropirogalol



Ácido 1,3,5-Tris(2-hidroxietyl)-Cianúrico

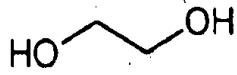


Ácido Gálico



3,5,7-Trihidroxiflavona

Tabla 1: continuación



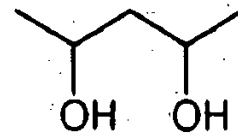
Etilen glicol



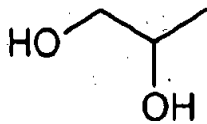
1,5-pentanodiol



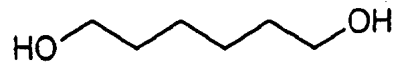
1,3-Propanodiol



2,4-Pentanodiol



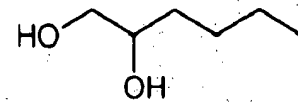
1,2-Propanodiol



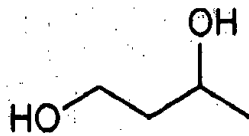
1,6-Hexanodiol



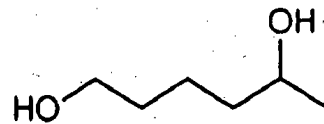
1,4-Butanodiol



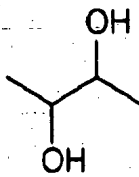
1,2-Hexanodiol



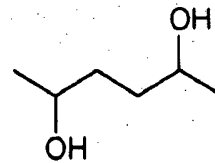
1,3-Butanodiol



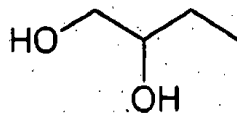
1,5-Hexanodiol



2,3-Butanodiol



2,5-Hexanodiol

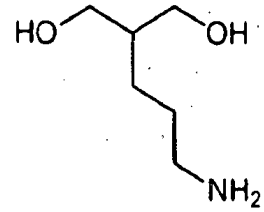


1,4-Butanodiol

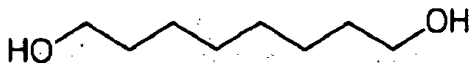
Tabla 1: continuación



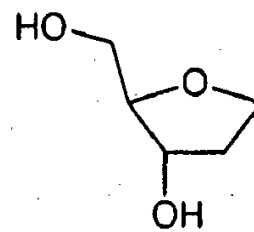
1,7-Heptanodiol



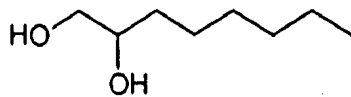
2-(1-Aminopropil)-1,3-propanodiol



1,8-Octanodiol



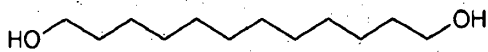
1,2-Didesoxirribosa



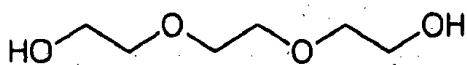
1,2-Octanodiol



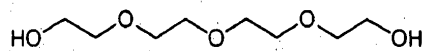
1,9-Nonanodiol



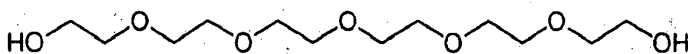
1,12-Dodecanodiol



Trietilen glicol



Trietaetilen glicol



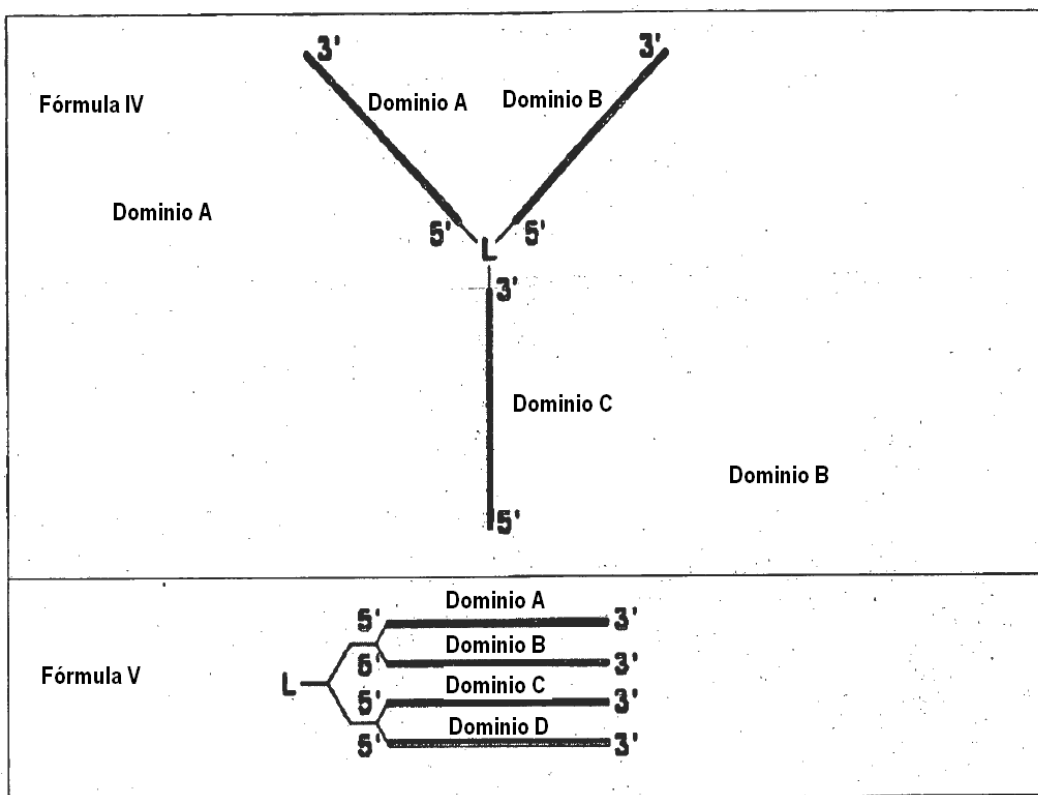
Hexaetilen glicol

En algunas realizaciones, el enlazador de molécula pequeña es glicerol o un homólogo de glicerol de la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$, en donde o y p son independientemente enteros que van de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4 o de 1 a aproximadamente 3. En algunas otras realizaciones, la molécula pequeña enlazadora es un derivado de 1,3-diamino-2-hidroxiopropano. Algunos de tales derivados tienen la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$, en donde m es un entero de 0 a aproximadamente 10, de 0 a aproximadamente 6, de 2 a aproximadamente 6 o de 2 a aproximadamente 4.

También se divulgan enlazantes no nucleótidos que permiten la unión de más de dos compuestos basados en oligonucleótidos. Por ejemplo, el glicerol enlazante de molécula pequeña tiene tres grupos hidroxilo al cual pueden unirse covalentemente tales oligonucleótidos. Algunos compuestos basados en oligonucleótidos divulgados aquí, por lo tanto, comprenden dos o más oligonucleótidos enlazados a un enlazante nucleótido o no nucleótido. Tales oligonucleótidos se denominan como "ramificados".

Los compuestos basados en oligonucleótidos divulgados aquí pueden comprender al menos dos oligonucleótidos antisentido enlazados con dos o más extremos 3' libres. Algunas de las maneras en las cuales dos o más oligonucleótidos pueden enlazarse se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Oligonucleótidos Fórmulas II - V	
Fórmula II	
<p style="text-align: center;"> 3' Dominio A 5' L 5' Dominio B 3' </p>	
<p style="text-align: center;"> 3' Dominio A Dominio B 3' </p> <p style="text-align: center;"> 5' L 5' </p> <p style="text-align: center;"> 5' </p> <p style="text-align: center;"> Dominio C </p> <p style="text-align: center;"> 3' </p>	



5 En ciertas realizaciones de las fórmulas II y/o V, L es un enlazante o un enlace nucleótido y el Dominio A y/o Dominio B son oligonucleótidos antisentido que están diseñados para hibridar selectivamente a la misma secuencia de ARN objetivo o a diferentes secuencias de ARN objetivo.

10 En ciertas realizaciones de las fórmulas II, III, IV o V, L es un enlazante y el Dominio A y/o el Dominio B y/o el Dominio C son oligonucleótidos antisentido que están diseñados para hibridar selectivamente a la misma secuencia de ARN objetivo o diferentes secuencias de ARN objetivo. Por ejemplo, en una realización, el Dominio A y/o el Dominio B y/o el Dominio C de las fórmulas II y/o III son oligonucleótidos antisentido que están diseñados para hibridar selectivamente a la misma secuencia de ARN objetivo. En esta realización, el Dominio A y/o el Dominio B y/o el Dominio C pueden ser diseñados para hibridar a la misma región sobre la secuencia de ARN objetivo o a diferentes regiones de la misma secuencia de ARN objetivo.

15 En una realización adicional, el Dominio A, el Dominio B y el Dominio C son independientemente oligonucleótidos basados en ARN o ADN. En ciertos aspectos de esta realización, los oligonucleótidos comprenden oligonucleótidos de esqueleto mixto.

En otra realización, uno o más de Dominio A y/o Dominio B y/o Dominio C de la fórmula IV es un oligonucleótidos antisentido que está diseñado para hibridar selectivamente a una secuencia de ARN objetivo y uno o más de los restantes Dominio A y/o Dominio B y/o Dominio C es un oligonucleótido antisentido que está diseñado para hibridar selectivamente a una secuencia de ARN objetivo diferente.

20 En otras realizaciones, uno o más de Dominio A, Dominio B o Dominio C de la fórmula IV es un antagonista de un receptor de superficie celular o intracelular. En ciertas realizaciones, el antagonista es un antagonista de TLR.

En otra realización, uno o más de Dominio A y/o Dominio B y/o Dominio C de la fórmula II, III, IV y/o V es un oligonucleótido basado en ARN hibridado a un oligonucleótido basado en ARN complementario de tal manera que el dominio comprende una molécula de ARNs.

25 Los oligonucleótidos componentes de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención tienen al menos 14 nucleótidos de longitud, pero tienen preferiblemente de 15 a 40 nucleótidos de longitud, preferiblemente de 20 a 30

nucleótidos de longitud. Así, los oligonucleótidos componentes de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención pueden tener independientemente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud. Estos oligonucleótidos pueden ser preparados por métodos reconocidos en el arte tales como química de fosforamidoato o H-fosfonato los cuales pueden ser llevados a cabo manualmente o mediante un sintetizador automatizado. Las metodologías sintéticas representativas se muestran en las figuras 1A y 1B. Los oligonucleótidos antisentido sintéticos de la invención también pueden ser modificados en un cierto número de formas sin comprometer su capacidad para hibridar ARNm. Tales modificaciones pueden incluir al menos un enlace internucleótidos del oligonucleótido siendo un alquifosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, metil fosfonato, éster de fosfato, alquifosfonotioato, fosforamidoato, carbamato, carbonato, hidroxil fosfato, acetamidoato o éster de carboximetilo o una combinación de estos y otros enlaces internucleótidos entre el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido en el cual el enlace fosfodiéster de nucleótido en 5' ha sido reemplazado con cualquier número de grupos químicos.

Los oligonucleótidos antisentido sintéticos de la invención pueden comprender combinaciones de enlaces internucleótidos. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,149,797 describe oligonucleótidos quiméricos tradicionales que tienen una región de núcleo de fosforotioato interpuesta entre las regiones flanqueantes de metil fosfonato o fosforamidoato. Adicionalmente, la Patente de los Estados Unidos No. 5,652,356 involucra oligonucleótidos quiméricos "invertidos" que comprenden una o más regiones de oligonucleótidos no iónicas (por ejemplo, enlace alquifosfonato y/o fosforamidoato y/o fosfotriéster internucleósidos) flanqueada por una o más regiones de fosforotioato de oligonucleótidos. Diversos oligonucleótidos antisentido sintéticos con enlaces internucleótidos modificados pueden ser preparados de acuerdo con métodos estándar. En ciertas realizaciones, los enlaces fosforotioato pueden ser enantiómeros Rp y Sp mixtos o pueden ser hechos estereorregulares o sustancialmente estereorregulares en forma bien sea Rp o Sp.

Otras modificaciones de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención incluyen aquellos que son internos o en los extremos de la molécula de oligonucleótido e incluyen adiciones a la molécula de los enlaces de fosfato internucleósidos tales como compuestos de colesterol, colesterilo o diamina con números variables de residuos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal, modificaciones en desoxirribosa y fosfato las cuales se escinden, o entrecruzan con las cadenas opuestas o con las enzimas asociadas u otras proteínas que se enlazan al genoma. Ejemplos de tales oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótidos con una base y/o azúcar modificadas tales como 2'-O,4'-C-metilen-b-D-ribofuranosilo o arabinosa en vez de ribosa o un oligonucleótido sustituido en 3', 5' que tiene un azúcar, la cual en sus posiciones 3' y 5' está enlazada a un grupo químico diferente a un grupo hidroxilo (en su posición 3') y diferente a un grupo fosfato (en su posición 5').

Otros ejemplos de modificaciones de azúcares de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención incluyen modificaciones a la posición 2' de la unidad estructural ribosa las cuales incluyen pero no se limitan a sustituir 2'-O- con un grupo -O-alquilo que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados, o con un grupo -O-arilo, o -O-alilo que tiene 2-6 átomos de carbono en donde tal grupo -O-alquilo, -O-arilo o -O-alilo puede ser no sustituido o puede ser sustituido, por ejemplo, con grupos halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxi, carbalcolxi o amino. En ninguna de estas sustituciones pretende excluir la presencia de otros residuos que tengan un grupo 2'-hidroxilo nativo en el caso de la ribosa o 2' H- en el caso de la desoxirribosa.

Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden comprender uno o más ribonucleótidos. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,652,355 divulga oligonucleótidos híbridos tradicionales que tienen regiones de ribonucleótidos sustituidos en 2'-O- que flanquean una región de núcleo de ADN. La Patente de los Estados Unidos No. 5,652,356 divulga un oligonucleótido híbrido "invertido" que incluye un oligonucleótido que comprende una región de ARN 2'-O- sustituida (o 2' OH no sustituida) la cual está entre dos regiones de oligodesoxirribonucleótidos, una estructura que "se invierte con respecto a los oligonucleótidos híbridos tradicionales". Ejemplos no limitantes de oligonucleótidos particularmente útiles de la invención tienen ribonucleótidos alquilados en 2'-O- en sus terminales 3', 5' o 3' y 5', con al menos cuatro, en algunas realizaciones de ejemplo cinco, nucleótidos contiguos modificados de esa manera. Ejemplos no limitantes de grupos alquilados en 2'-O- incluyen 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-butil y 2'-O-metoxi-etilo.

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención pueden ser sintetizados convenientemente utilizando un sintetizador automatizado y la metodología de fosforamidoato tal como se representa esquemáticamente en la figura 1B, y como se describe adicionalmente en el Ejemplo 1. En algunas realizaciones, los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención son sintetizados por una metodología de síntesis lineal (véase figura 1A).

Un modo alternativo de síntesis es la "síntesis en paralelo", en la cual la síntesis procede hacia afuera desde una unidad estructural enlazante central (véase figura 1). Un enlazante unido a un soporte sólido puede ser utilizado para la síntesis

en paralelo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,912,332. Alternativamente, puede utilizarse un soporte sólido universal (tal como fosfato unido a vidrio poroso controlado).

5 La síntesis en paralelo de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención tiene varias ventajas sobre la síntesis lineal: (1) la síntesis en paralelo permite la incorporación de unidades monoméricas idénticas; (2) a diferencia de la síntesis lineal, ambas (o todas) las unidades monoméricas son sintetizadas en el mismo momento, por lo cual el número de etapas sintéticas y el tiempo requerido para la síntesis son los mismos que para una unidad monomérica; y (3) la reducción en las etapas sintéticas mejora la pureza y el rendimiento del producto de oligorribonucleótido modulador inmune final.

10 Al final de la síntesis bien sea por protocolo de síntesis lineal o de síntesis paralela, los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención pueden ser desprotegidos convenientemente con solución de amoníaco concentrado o según lo recomiende el proveedor de la fosforamidita, si se incorpora un nucleósido modificado. Los compuestos producidos con base en oligonucleótidos son purificados preferiblemente por HPLC en fase reversa, destritilados, desalinizados y dializados.

15 Una lista no limitante de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se muestran en SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 175 en la Tabla 3 a continuación. Como se muestra en la Tabla 3, los compuestos basados en oligonucleótidos tienen enlaces fosforotioato (PS), pero también pueden incluir enlaces fosfodiéster (o). Los experimentados en la técnica reconocerán, sin embargo, que pueden incluirse otros enlaces, con base en unidades estructurales fosfodiéster o no fosfodiéster.

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies)	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
1 / AS1	TLR9	ADN (h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 1)-3'
2 / AS2	TLR9	ADN (h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 2)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 2)-3'
3 / AS3	TLR9	ADN (h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 3)-3'-X-3'-(SEQ ID NO. 3)-5'
4 / AS4	TLR9	ARN (h)	5'-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 4)-3'
5 / AS5	TLR9	ARN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 5)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 5)-3'
6 / AS6	TLR9	ADN (m/h)	3'- <u>ACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCA</u> -3'	3'-(SEQ ID NO. 6)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 6)-3'
7 / AS7	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 7)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 7)-3'
8 / AS8	TLR9	ADN (m/h)	3'-AoCCoGACAAGGACTTCAoGAoCAo-X-oACoAgOACTTCAGGAACAGoCCoA-3'	3'-(SEQ ID NO. 8)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 8)-3'
9 / AS9	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X3-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-	3'-(SEQ ID NO. 9)-5'-X3-5'-(SEQ ID NO. 9)-3'
10 / AS10	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X1-ACAGACTTCAGCAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 10)-5'-X1-5'-(SEQ ID NO. 10)-3'
11 / AS11	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-Z-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 11)-5'-Z-5'-(SEQ ID NO. 11)-3'
12 / AS12	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-M-ACAGAGTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 12)-5'-M-5'-(SEQ ID NO. 12)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies)	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
13 / AS13	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-L-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 13)-5'-L-5'-(SEQ ID NO. 13)-3'
14 / AS14	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACAAGCACT <u>UCAGACA</u> -X- <u>ACAGACU</u> TCAGGAACACCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 14)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 14)-3'
15 / AS15	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X- <u>ACAGACT</u> TCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 15)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 15)-3'
16 / AS16	TLR9	ADN (m/h)	3'-ACCGACA <u>AGGACU</u> TCAGACA-X-ACAGACT <u>UCAGGA</u> ACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 16)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 16)-3'
17 / AS17	TLR9	ARN (m/h)	3'-AGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 17)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 17)-3'
18 / AS18	TLR9	ARN (m/h)	3'-CAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 18)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 18)-3'
19 / AS19	TLR9	ARN (h)	3'-ACGCCGUAGAGUUGGAGUUC-X-CUUGAGGUUGAGAUGCCGCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 19)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 19)-3'
20 / AS20	TLR7	ADN (m)	3'-CCTGACGTGTCTGTTCGTAA-X-AATGCTTGTCTGTGCAGTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 20)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 20)-3'
21 / AS21	TLR7	ARN (m)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 21)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 21)-3'
22 / AS22	TLR7	ARN (m)	3'-UCGUGUGUUUCCAGUUUCA-X-ACUUUGACCUUUGUGUGCU-3'	3'-(SEQ ID NO. 22)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 22)-3'
23 / AS23	TLR7	ARN (h)	3'-UUGUAGUUGUUUGAGGUCC-X-CCUGGAGUUUGUUGAUGUU-3'	3'-(SEQ ID NO. 23)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 23)-3'
24 / AS24	MyD88	ADN (m)	3'-GTCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCAGCCTG-3'	3'-(SEQ ID NO. 24)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 24)-3'

ES 2 538 347 T3

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
25 / AS25	MyD88	ARN (m)	3'-GUCCGACGAUCUCGACGACC-X- CCAGCAGCUCUAGCAGCCUG-3'	3'-(SEQ ID NO. 25)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 25)-3'
26 / AS26	TLR7	ADN (m)	5'-AATGCTTGTCTGTGCAGTCC-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 26)-3'
27 / AS27	TLR7	ADN (m)	3'-CCTGACGTGTCTGTTCGTAA-X- AATGCTTGTCTGTGCAGTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 27)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 27)-3'
28 / AS28	TLR7	ARN (m/h)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA- 5'(Control)	3'-(SEQ ID NO. 28)-5'
29 / AS29	TLR7	ARN (m/h)	5'- CUGUCoAoAoAoUoGoCoUoUoGoUoGoUo GoUoGoCoAoGoUoCoCo ACGAU-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 29)-3'
30 / AS30	TLR9	ADN (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCC-3	3'-(SEQ ID NO. 30)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 30)-3'
31 / AS31	TLR9	ADN (m/h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCC-X- CCGACAAGGACTTCAGACA-5' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 31)-3'-X- 3'-(SEQ ID NO. 31)-5'
32 / AS32	TLR9	ADN (m/h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 32)-3'
33 / AS33	TLR7	ADN (m/h)	3'-CTGACGTGTCTGTTCGTAA-X- AATGCTTGTCTGTGCAGTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 33)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 33)-3'
34 / AS34	TLR7	ADN (m/h)	5'-AATGCTTGTCTGTGCAGTC-X- CTGACGTGTCTGTTCGTAA-5' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 34)-3'-X- 3'-(SEQ ID NO. 34)-5'
35 / AS35	TLR7	ADN (m/h)	5'-AATGCTTGTCTGTGCAGTCC-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 35)-3'
36 / AS36	MyD88	ADN (h)	3'-CGTTGACCTCTGTGTTTCGC-X- CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 36)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 36)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies)	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
37 / AS37	MyD88	ADN (h)	5'-CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-X-CGTTGACCTCTGTGTTCCGC-5' (Control)	5'-(SEQ ID NO 37)-3'-X-3'-(SEQ ID NO. 37)-5'
38 / AS38	MyD88	ADN (h)	5'-CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 38)-3'
39 / AS39	VEGF	ADN (h)	3'-GAAAGACGACAGAACCAC-X-CACCCAAGACAGCAGAAAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 39)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 39)-3'
40 / AS40	VEGF	ADN (h)	5'-CACCCAAGACAGCAGAAAG-X-GAAAGACGACAGAACCAC-5' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 40)-3'-X-3'-(SEQ ID NO. 40)-5'
41 / AS41	VEGF	ADN (h)	5'-CACCCAAGACAGAAAG-3' (Control)	5'-(SEQ ID NO. 41)-3'
42 / AS42	TLR9	ADN (m/h)	3'-CAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 42)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 42)-3'
43 / AS43	TLR9	ADN (m/h)	3'-GACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 43)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 43)-3'
44 / AS44	TLR9	ADN (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 44)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 44)-3'
45 / AS45	TLR9	ADN (m/h)	3'-AACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCAA-3'	3'-(SEQ ID NO. 45)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 45)-3'
46 / AS46	TLR9	ADN (m/h)	3'-TTAACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCAATT-3'	3'-(SEQ ID NO. 46)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 46)-3'
47 / AS47	TLR9	ADN (m/h)	3'-CGTTAACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCAATTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 47)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 47)-3'
48 / AS48	TLR9	ADN (m/h)	3'-GACGTTAACCGACAAGGACTTCAGACA-XACAGACTTCAGGAACAGCCAATTGCAG-3	3'-(SEQ ID NO. 48)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 48)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
49 / AS49	TLR9	ADN (h)	3'-GACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 49)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 49)-3'
50 / AS50	TLR9	ADN (h)	3'-TTGACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCCAGTT-3'	3'-(SEQ ID NO 50)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 50)-3'
51 / AS51	TLR9	ADN (m/h)	3'- CoCoGoAoCoAoGoGoAoCoToToCoAoG oAoCoAo- XoAoCoAoGoAoCoToToCoAoGoGoAoAoCo AoGoCoC- 3'	3'-(SEQ ID NO. 51)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 51)-3'
52 / AS52	TLR9	ADN (m/h)	5'-C-3'-3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'-3'-C-5'	3'-(SEQ ID NO. 52)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 52)-3'
53 / AS53	TLR9	ADN (m/h)	5'-GCC-3'-3'-CCGACAAGGACTTCAGACA- X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'-3'-CCG- 5'	3'-(SEQ ID NO. 53)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 53)-3'
54 / AS54	TLR9	ADN (m/h)	5'-CAGCC-3'-3'- CCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCC3'-3'- CCGAC-5'	3'-(SEQ ID NO. 54)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 54)-3'
55 / AS55	TLR9	ADN (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 55)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 55)-3'
56 / AS56	TLR9	ADN (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 56)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 56)-3'
57 / AS57	TLR9	ADN (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA- ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 57)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 57)-3'
58 / AS58	TLR9	ADN (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-Y- ACAGACTTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 58)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 58)-3'
59 / AS59	TLR9	ADN (m/h)	3'-CTTCAGACA-X-ACAGACTTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 59)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 59)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
60 / AS60	TLR9	ADN (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 60)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 60)-3'
61 / AS61	TLR9	ADN (m/h)	3'-TTGACCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCCAGTT-3'	3'-(SEQ ID NO. 61)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 61)-3'
62 / AS62	TLR9	ADN (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X5- ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 62)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 62)-3'
63 / AS63	TLR7	ADN (m/h)	3'-GACGTGTCTGTTCGTAA-X- AATGCTTGTCTGTGCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 63)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 63)-3'
64 / AS64	TLR7	ADN (m/h)	3'-CTGACGTGTCTGTTCGTAA-X- AATGCTTGTCTGTGCAGTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 64)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 64)-3'
65 / AS65	TLR7	ADN (m/h)	3'-ACCTGACGTGTCTGTTCGTAA-X- AATGCTTGTCTGTGCAGTCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 65)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 65)-3'
66 / AS66	MyD88	ADN (m)	3'-ACGATCTCGACGACC-X- CCAGCAGCTCTAGCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 66)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 66)-3'
67 / AS67	MyD88	ADN (m)	3'-CGACGATCTCGACGACC-X- CCAGCAGCTCTAGCAGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 67)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 67)-3'
68 / AS68	MyD88	ADN (m)	3'-TCCGACGATCTCGACGACC-X- CCAGCAGCTCTAGCAGCCT-3'	3'-(SEQ ID NO. 68)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 68)-3'
69 / AS69	MyD88	ADN (m)	3'-CGTCCGACGATCTCGACGACC-X- CCAGCAGCTCTAGCAGCCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 69)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 69)-3'
70 / AS70	MyD88	ADN (m)	3'-GCCGTCCGACGATCTCGACGACC-X- CCAGCAGCTCTAGCAGCCTGCCG-3'	3'-(SEQ ID NO. 70)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 70)-3'
71 / AS71	MyD88	ADN (m)	3'-CAGCCGTCCGACGATCTCGACGACC- X-CCAGCAGCTCTAGCAGCCTGCCGAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 71)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 71)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
72 / AS72	MyD88	ADN (h)	3'-GACCTCTGTGTTTCGC-X- CGCTTGTGTCTCCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 72)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 72)-3'
73 / AS73	MyD88	ADN (h)	3'-TTGACCTCTGTGTTTCGC-X- CGCTTGTGTCTCCAGTT-3'	3'-(SEQ ID NO. 73)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 73)-3'
74 / AS74	MyD88	ADN (h)	3'-CGTTGACCTCTGTGTTTCGC-X- CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 74)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 74)-3'
75 / AS75	MyD88	ADN (h)	3'-GCCGTTGACCTCTGTGTTTCGC-X- CGCTTGTGTCTCCAGTTGCCG-3'	3'-(SEQ ID NO. 75)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 75)-3'
76 / AS76	MyD88	ADN (h)	3'-AGGCCGTTGACCTCTGTGTTTCGC-X- CGCTTGTGTCTCCAGTTGCCGGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 76)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 76)-3'
77 / AS77	MyD88	ADN (h)	3'-CTAGGCCGTTGACCTCTGTGTTTCGC-X- CGCTTGTGTCTCCAGTTGCCGGATC-3'	3'-(SEQ ID NO. 77)-5'-X- 5'-(SEQ IDNO. 77)-3'
78 / AS78	MyD88	ADN (m)	3'- <u>UCCGACGATCTCGACGACC-X- CCAGCAGCTCTAGCAGCCU-3'</u>	3'-(SEQ ID NO. 78)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 78)-3'
79 / AS79	MyD88	ADN (h)	3'- <u>CGUUGACCTCTGTGTUCGC-X- CGCUTGTGTCTCCAGUUGC-3'</u>	3'-(SEQ ID NO. 79)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 79)-3'
80 / AS80	MyD88	ADN (h)	3'-CGTTGACCTCTGTGTTTCGC-Z- CGCTTGTGTC TCCAGTTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 80)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 80)-3'
81 / AS81	MyD88	ADN (h)	(3'-CGTTGACCTCTGTGTTTCGC) ₂ -Z-Z-Z- (CGCTTGTG-TCTCCAGTTGC-3') ₂	3'-(SEQ ID NO. 81)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 81)-3'
82 / AS82	TLR3	ADN (m)	3'-CTTGGAGGTTCTTGACG-X- GCAGTTCTTGGAGGTTTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 82)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 82)-3'
83 / AS83	TLR3	ADN (m)	3'-CTCTTGGAGGTTCTTGACG-X- GCAGTTCTTGGAGGTTCTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 83)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 83)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
84 / AS84	TLR3	ADN (m)	3'-ACCTCTTGGAGGTTCTTGACG-X- GCAGTTCTTGGAGGTTCTCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 84)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 84)-3'
85 / AS85	TLR3	ADN (h)	3'-CGTGGAATTGTACCTTC-X- CTTCCATGTTAAGGTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 85)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 85)-3'
86 / AS86	TLR3	ADN (h)	3'-CTCGTGGAATTGTACCTTC-X- CTTCCATGTTAAGGTGCTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 86)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 86)-3'
87 / AS87	TLR3	ADN (h)	3'-ACCTCGTGGAATTGTACCTTC-X- CTTCCATGTTAAGGTGCTCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 87)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 87)-3
88 / AS88	VEGF	ADN (h)	3'-GAAAGACGACAGAACCCAC-X- CACCCAAGACAGCAGAAAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 88)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 88)-3'
89 / AS89	Mdm2	ADN (h)	3'-CACTCTTGTCCACAG-X- GACACCTGTTCTCAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 89)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 89)-3'
90 / AS90	Mdm2	ADN (h)	3'-CTCACTCTTGTCCACAG-X- GACACCTGTTCTCACTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 90)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 90)-3'
91 / AS91	Mdm2	ADN (h)	3'-CACTCACTCTTGTCCACAG-X- GACACCTGTTCTCACTCAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 91)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 91)-3'
92 / AS92	Mdm2	ADN (h)	3'-GACACTCACTCTTGTCCACAG-X- GACACCTGTTCTCACTCACAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 92)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 92)-3'
93 / AS93	Mdm2	ADN (h)	3'-TAGACACTCACTCTTGTCCACAG-X- GACACCTGTTCTCACTCACAGAT-3'	3'-(SEQ ID NO. 93)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 93)-3'
94 / AS94	Mdm2	ADN (h)	3'-CACTCACTCTTGTCCACAG-Y- GACACCTGT-3'	3'-(SEQ ID NO. 94)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 94)-3'
95 / AS95	Mdm2	ADN (h)	3'-TGTCCACAG-X-GACACCTGT-3'	3'-(SEQ ID NO. 95)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 95)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
96 / AS96	BCL2	ADN (h)	3'-CCTCTATCACTACTTCATG-X-GTACTTCATCACTATCTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 96)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 96)-3'
97 / AS97	Survivin	ADN (h)	3'-CCTGTCTCTTTCTCGGTTC-X-CTTGCTCTTCTCTGTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 97)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 97)-3'
98 / AS98	EGFR	ADN (h)	3'-GTTTCGACACTGTCTAGTAT-X-TATGATCTGTACAGCTTG-3'	3'-(SEQ ID NO. 98)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 98)-3'
99 / AS99	EGFR	ADN (h)	3'-CTTCCCTCCTTTGGATCG-X-GCTAGGTTTCCTCCCTTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 99)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 99)-3'
100 / AS100	PCSK9	ADN (h)	3'-CTCCGTCTCTGACTAGGTG-X-GTGGATCAGTCTCTGCCTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 100)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 100)-3'
101 / AS101	PCSK9	ADN (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACAT-Y-TACACCTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 101)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 101)-3'
102 / AS102	PCSK9	ADN (h)	3'-CTCCGTCTCTGACTAGGTG-Y-GTGGATCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 102)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 102)-3'
103 / AS103	PCSK9	ADN (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTC-Y-CTTGACTTT-3'	3'-(SEQ ID NO. 103)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 103)-3'
104 / AS104	PCSK9	ADN (h)	3'-CCTCCACAT-X-TACACCTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 104)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 104)-3'
105 / AS105	PCSK9	ADN (h)	3'-GACTAGGTG-X-GTGGATCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 105)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 105)-3'
106 / AS106	PCSK9	ADN (h)	3'-TTTCAGTTC-X-CTTGACTTT-3'	3'-(SEQ ID NO. 106)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 106)-3'
107 / AS107	PCSK9	ADN (h)	3'-AGACCTTACGTTTCA-X-ACTTTCATTCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 107)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 107)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
108 AS108	/ PCSK9	ADN (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGT-X- TGACTTTGCATTCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 108)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 108)-3'
109 AS109	/ PCSK9	ADN (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTC-X- CTTGACTTTGCATTCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 109)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 109)-3
110 AS110	/ PCSK9	ADN (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTCCT-X- TCCTTGACTTTGCATTCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 110)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 110)-3'
111 AS111	/ PCSK9	ADN (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTCCTCG-X- GCTCCTTGACTTTGCATTCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 111)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 111)-3'
112 AS112	/ PCSK9	ADN (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTCCTCGTA-X- ATGCTCCTTGACTTTGCATTCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 112)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 112)-3'
113 AS113	/ PCSK9	ADN (h)	3'-CGTCGGACCACCTCC-X- CCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 113)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 113)-3'
114 AS114	/ PCSK9	ADN (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCAC-X- CACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 114)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 114)-3'
115 AS115	/ PCSK9	ADN (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACAT-X- TACACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 115)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 115)-3'
116/ AS116	PCSK9	ADN (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACATAG-X- GATACACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 116)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 116)-3'
117 AS117	/ PCSK9	ADN (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACATAGAG-X- GAGATACACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 117)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 117)-3'
118 AS118	/ PCSK9	ADN (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACATAGAGGA- X-AGGAGATACACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 118)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 118)-3'
119 AS119	/ PCSK9	ADN (M)	3'-CCAGGAAGTCTCGTCCAGT-X- TGACCTGCTCTGAAGGACC-3'	3'-(SEQ ID NO. 119)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 119)-3'

ES 2 538 347 T3

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
120 AS120 /	TLR9	ARN (m/h)	3'-GACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 120)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 120)-3'
121 AS121 /	TLR9	ARN (m/h)	3'-CCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 121)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 121)-3'
122 AS122 /	TLR9	ARN (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAA-3'	3'-(SEQ ID NO. 122)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 122)-3'
123 AS123 /	TLR9	ARN (m)	3'-UUAACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAAUU-3'	3'-(SEQ ID NO. 123)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 123)-3'
124 AS124 /	TLR9	ARN (m)	3'-CGUUAACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAAUUGG-3'	3'-(SEQ ID NO. 124)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 124)-3'
125 AS125 /	TLR9	ARN (m)	3'-GACGUUAACCGACAAGGACUUCAGACA-XACAGACUUCAGGAACAGCCAAUUGCAG - 3'	3'-(SEQ ID NO. 125)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 125)-3'
126 AS126 /	TLR9	ARN (h)	3'-GACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 126)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 126)-3'
127 AS127 /	TLR9	ARN (h)	3'-UUGACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAGUU-3'	3'-(SEQ ID NO. 127)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 127)-3'
128 AS128 /	TLR9	ARN (h)	3'-CGUUGACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAGUUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 128)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 128)-3'
129 AS129 /	TLR9	ARN (m/h)	3'- ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-AC-3'	3'-(SEQ ID NO. 129)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 129)-3'
130 AS130 /	TLR9	ARN (m/h)	3'- ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-ACAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 130)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 130)-3'
131 AS131 /	TLR9	ARN (m/h)	3'- ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-ACAGAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 131)-5'-X-5'-(SEQ ID NO 131)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
132 / AS132	TLR9	ARN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X3- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 132)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 132)-3'
133 / AS133	TLR9	ARN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X1- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 133)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 133)-3'
134 / AS134	TLR9	ARN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Z- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO 134)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 134)-3'
135 / AS135	TLR9	ARN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-M- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 135)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 135)-3'
136 / AS136	TLR9	ARN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-L- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 136)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 136)-3'
137 / AS137	TLR9	ARN (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 137)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 137)-3'
138 / AS138	TLR9	ARN (m/h)	3'- ACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 138)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 138)-3'
139 / AS139	TLR9	ARN (m)	3- A ACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCC AA -3'	3'-(SEQ ID NO. 139)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 139)-3'
140 / AS140	TLR9	ARN (m)	3- A ACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCC AA -3'	3'-(SEQ ID NO. 140)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 140)-3'
141 / AS141	TLR9	ARN (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCCAA -3'	3'-(SEQ ID NO. 141)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 141)-3'
142 / AS142	TLR9	ARN (m)	3'- A ACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCC AA -3'	3'-(SEQ ID NO. 142)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 142)-3'
143 / AS143	TLR9/ TLR7	ARN/ ADN (m/h)	3-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y- d(AATGCTTGTCTGTGCAGTCC)-3'	3'-(SEQ ID NO. 132)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 35)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
144 AS144	/ MyD88	ARN (m)	3'-ACGAUCUCGACGACC-X- CCAGCAGCUCUAGCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 144)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 144)-3'
145 AS145	/ MyD88	ARN (m)	3'-CGACGAUCUCGACGACC-X- CCAGCAGCUCUAGCAGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 145)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 145)-3'
146 AS146	/ MyD88	ARN (m)	3'-UCCGACGAUCUCGACGACC-X- CCAGCAGCUCUAGCAGCCU-3'	3'-(SEQ ID NO. 146)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 146)-3'
147 AS147	/ MyD88	ARN (m)	3'-CGUCCGAGGAUCUCGACGACC-X- CCAGCAGCUCUAGCAGCCUGC-3	3'-(SEQ ID NO. 147)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 147)-3'
148 AS148	/ MyD88	ARN (m)	3'-GCCGUCCGACGAUCUCGACGACC-X- CCAGCAGCUCUAGCAGCCUGCCG-3'	3'-(SEQ ID NO. 148)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 148)-3'
149 AS149	/ MyD88	ARN (m)	3'-CAGCCGUCCGACGAUCUCGACGACC- X-CCAGCAGCUCUAGCAGCCUGCCGAC- 3'	3'-(SEQ ID NO. 149)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 149)-3'
150 AS150	/ MyD88	ARN (h)	3'-GACCUCUGUGUUCGC-X- CGCUUGUGUCUCCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 150)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 150)-3'
151 AS151	/ MyD88	ARN (h)	3'-UUGACCUCUGUGUUCGC-X- CGCUUGUGUCUCCAGUU-3'	3'-(SEQ ID NO. 151)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 151)-3'
152 AS152	/ MyD88	ARN (h)	3'-CGUUGACCUCUGUGUUCGC-X- CGCUUGUGUCUCCAG-UUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 152)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 152)-3'
153 AS153	/ MyD88	ARN (h)	3'-GCCGUUGACCUCUGUGUUCGC-X- CGCUUGUGUCUCCAGUUGCCG-3'	3'-(SEQ ID NO. 153)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 153)-3'
154 AS154	/ MyD88	ARN (h)	3'-AGGCCGUUGACCUCUGUGUUCGC-X- CGCUUGUGUCUCCAGUUGCCGGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 154)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 154)-3'
155 AS155	/ MyD88	ARN (h)	3'-CUAGGCCGUUGACCUCUGUGUUCGC- X-CGCUUGUGUCUCCAGUUGCCGGAUC- 3'	3'-(SEQ ID NO. 155)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 155)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies)	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
156 / AS156	TLR7	ARN (m/h)	3'-CGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGGUUGUCUGUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 156)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 156)-3'
157 / AS157	TLR7	ARN (m/h)	3'-GACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 157)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 157)-3'
158 / AS158	TLR7	ARN (m/h)	3'-CUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 158)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 158)-3'
159 / AS159	TLR7	ARN (m/h)	3'-ACCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 159)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 159)-3'
160 / AS160	TLR7	ARN (m/h)	3'-GCACCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCACG-3'	3'-(SEQ ID NO. 160)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 160)-3'
161 / AS161	TLR7	ARN (m/h)	3'-UAGCACCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCACGAU-3'	3'-(SEQ ID NO. 161)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 161)-3'
162 / AS162	TLR7/ TLR9	ARN/ ADN (m/h)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-Y-d(ACAGACTTCAGGAACAGCCA)-3'	3'-(SEQ ID NO. 21)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 1)-3'
163 / AS163	TLR3	ARN (m)	3'-CUUGGAGGUUCUUGACG-X-GCAGUUCUUGGAGGUUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 163)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 163)-3'
164 / AS164	TLR3	ARN (m)	3'-CUCUUGGAGGUUCUUGACG-X-GCAGUUCUUGGAGGUUCUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 164)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 164)-3'
165 / AS165	TLR3	ARN (m)	3'-ACCUCUUGGAGGUUCUUGACG-X-GCAGUUCUUGGAGGUUCUCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 165)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 165)-3'
166 / AS166	TLR3	ARN (m)	3'-CAAGUCGUUCGAUAACUCG-X-GCUCAAUAGCUUGCUGAAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 166)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 166)-3'
167 / AS167	TLR3	ARN (h)	3'-CGUGGAAUUGUACCUUC-X-CUCCAUGUUAAGGUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 167)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 167)-3'

TABLA 3				
SEQ ID NO. / AS#	ARNm Objetivo	ADN / ARN (especies))	Secuencias de ejemplo de la invención y oligonucleótidos de la invención	Estructura
168/ AS168	TLR3	ARN (h)	3'-CUCGUGGAAUUGUACCUUC-X- CUUCCAUGUUAAGGUGCUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 168)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 168)-3'
169 / AS169	TLR3	ARN (h)	3'-ACUCGUGGAAUUGUACCUUC-X- CUUCCAUGUUAAGGUGCUCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 169)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 169)-3'
170 / AS170	TLR3	ARN (h)	3'-GUUGUUGUUGUAUCGGUUG-X- GUUGGCUAUGUUGUUGUUG-3'	3'-(SEQ ID NO. 170)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 170)-3'
171 / AS171	MDM2	ARN (h)	3'-UCACUCUUGUCCACAGU-X- UGACACCUGUUCUCACU-3'	3'-(SEQ ID NO. 171)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 171)-3'
172 / AS172	MDM2	ARN (h)	3'-ACUCACUCUUGUCCACAGU-X- UGACACCUGUUCUCACUCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 172)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 172)-3'
173 / AS173	MDM2	ARN (h)	3'-ACACUCACUCUUGUCCACAGU-X- UGACACCUGUUCUCACUCACA-3'	3'-(SEQ ID NO. 173)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 173)-3'
174 / AS174	MDM2	ARN (m)	3'-GGACUUCCACCCUCACUAG-X- GAUCACUCCCACCUUCAGG-3'	3'-(SEQ ID NO. 174)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 174)-3'
175 / AS175	VEGF	ARN (h)	3'-CACCCAAGACAGCAGAAAG-X- GAAAGACGACAGAACCCAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 175)-5'-X- 5'-(SEQ ID NO. 175)-3'

X = enlazante glicerol; X1 = enlazante 1,2,4-butanotriol; X3 = enlazante 2-hidroximetil-1,3-propanodiol; X5 = enlazante Bis-1,5-O-(3'timidil)-1,3,5-pentanotriol; Y = enlazante 1,3-propanodiol; Z = enlazante 1,3,5-pentanotriol; M = enlazante *cis,cis*-1,3,5-ciclohexanotriol; L = enlazante *cis,trans*-1,3,5-ciclohexanotriol; A, U, C, G = 2'-OMe; o = enlace internucleótido fosfodiéster; h = humano; m = ratón; excepto cuando se indica, todas las moléculas en la Tabla 3 contienen enlaces internucleótido de fosforioato

En este aspecto de la invención, la composición carece de actividad estimuladora inmune de ciertas composiciones de oligonucleótidos. Es sabido que ciertas composiciones basadas en oligonucleótidos pueden poseer motivos estimuladores inmunes. Esta actividad estimuladora inmune requiere que los oligonucleótidos estén no enlazados o enlazados en sus extremos 3'. Así, se contempla que como resultado de las composiciones basadas en oligonucleótidos de acuerdo con la invención el uso de un enlace en los extremos 5', como se define en las fórmulas I, II, III o IV, que cualquier actividad estimuladora inmune inherente está suprimida, en comparación con la actividad estimuladora inmune que estaría presente en composiciones basadas en oligonucleótidos o enlazadas o no enlazadas en los extremos 3' o en una forma 2'-5'.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la estructura del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención provee un compuesto óptimo para enlazamiento a enzimas y otras proteínas que están involucradas en la inhibición mediada por AARNsaH y/o mediada por iARN. Así, en una realización adicional de este aspecto de la invención, los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden ser enlazados selectivamente por AARNsaH, Dicer, Argonaut, RISC u otras proteínas que están involucradas en la inhibición mediada por ARNi de la expresión genética. Este enlazamiento selectivo provee compuestos basados en oligonucleótidos óptimos para utilizar la inhibición mediada por AARNsaH y/o mediada por iARN de la expresión genética *in vitro* e *in vivo*.

En un segundo aspecto, la invención provee formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención y un vehículo fisiológicamente aceptable.

También se divulga, en un tercer aspecto, un método para inhibir la expresión genética, comprendiendo el método poner en contacto una célula con un compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

También se divulga, en un cuarto aspecto, para inhibir la expresión genética en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero un compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En una realización adicional de este aspecto, se contempla que los compuestos sintéticos basados en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención pueden inhibir la expresión y actividad de ciertos genes relacionados con la proliferación celular, incluyendo pero no limitándose a oncógenos.

También se divulga, en un quinto aspecto, un método para inhibir una respuesta mediada por TLR, mediada por Bcl-2, mediada por EGFR, mediada por mdm2, mediada por MyD88, mediada por PCSK9, mediada por survivina o mediada por VEGF en un mamífero a través de la administración de un compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención en donde los oligonucleótidos son complementarios a una o más secuencias de ARNm que codifican una molécula involucrada en la señalización de TLR o en la actividad de Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF.

También se divulga, en un sexto aspecto, un método para inhibir una respuesta mediada por TLR, mediada por Bcl-2, mediada por EGFR, mediada por mdm2, mediada por MyD88, mediada por PCSK9, mediada por survivina o mediada por VEGF en un mamífero a través de la administración de un compuesto sintético basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención en donde los oligonucleótidos son complementarios a una o más secuencias de ARNm de TLR, Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF en combinación con un antagonista de la actividad de las proteínas de TLR, Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF.

También se divulgan, en un séptimo aspecto, métodos para inhibir la expresión genética en un mamífero, comprendiendo tales métodos administrar al mamífero un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, el mamífero es un humano. En realizaciones preferidas, el compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención es administrado a un mamífero que requiere inhibir su respuesta inmune.

También se divulgan, en un octavo aspecto, métodos para tratar terapéuticamente un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, comprendiendo tales métodos la administración al paciente de un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva. En diversas realizaciones, la enfermedad o trastorno que se va a tratar es cáncer, un trastorno autoinmune, enfermedad infecciosa, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, alergia, asma, o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

También se divulgan, en un noveno aspecto, métodos para prevenir una enfermedad o trastorno, comprendiendo tales métodos la administración a un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno de un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva. Un sujeto es considerado en riesgo para desarrollar una enfermedad o trastorno si el sujeto ha estado o puede estar o será expuesto a un agente etiológico de la enfermedad o trastorno o está predispuesto genéticamente para contraer la enfermedad o trastorno. En diversas realizaciones, la enfermedad o trastorno que puede ser prevenida es cáncer, un trastorno autoinmune,

inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma, o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

También se divulga, en un décimo aspecto, un método para prevenir o tratar un trastorno, comprendiendo tal método el aislamiento de células capaces de producir citoquinas o quimioquinas que incluyen, pero no se limitan a, células inmunes, células reguladoras T, células B, PBMC, pDCs y células linfoides; cultivar tales células bajo condiciones de cultivo celular estándar, tratando tales células ex vivo con un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención de tal manera que las células aisladas produzcan o secreten niveles disminuidos de citoquina o quimioquinas, y administrando o readministrando las células tratadas a un paciente que requiere de terapia para inhibir las citoquinas y/o quimioquinas para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad. Este aspecto estaría de acuerdo con técnicas de inmunoterapia celular adoptivas estándar para producir células inmunes activadas.

En algunas realizaciones de este aspecto, las células capaces de producir citoquinas o quimioquinas pueden ser aisladas a partir de sujetos con o sin una enfermedad o trastorno. Tal aislamiento puede incluir la identificación y selección y podría ser llevado a cabo utilizando procedimientos de aislamiento celular estándares, incluyendo los definidos en los ejemplos específicos más abajo. Tales células aisladas serían cultivadas de acuerdo con procedimientos de cultivos celular estándares y utilizando condiciones de cultivos celular estándares, las cuales pueden incluir los procedimientos y condiciones de cultivo definidas en los ejemplos específicos más abajo. En un aspecto adicional de esta realización, las células aisladas serían cultivadas en la presencia de al menos un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención, en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para suprimir o inhibir la producción y/o secreción de citoquinas y/o quimioquinas en comparación con las células aisladas cultivadas en la ausencia de tales uno o más compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Tal tiempo puede ser de minutos, a horas, a días. Tales células aisladas y tratadas pueden encontrar uso después de la administración al donante o administración a un segundo paciente, en donde tal donante o segundo paciente está en necesidad de producción y/o secreción suprimida o inhibida de citoquinas y/o quimioquinas. Por ejemplo, la readministración a un donante o la administración a un segundo paciente que tiene cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma, o una enfermedad causada por un patógeno. Tal readministración o administración pueden lograrse utilizando diversos modos, incluyendo administración por catéter o inyección o cualquier otra ruta efectiva. Este aspecto puede encontrar uso también en pacientes que tengan una capacidad limitada o incompleta para remontar una respuesta inmune o están comprometidos o tienen compromiso inmune (por ejemplo, pacientes infectados con VIH y pacientes con trasplante de médula ósea).

También se divulga, en un décimo primer aspecto, una composición que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención y una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos (tanto quimioterapia tradicional como terapias direccionadas modernas), inhibidores de quinasa, alérgenos, antibióticos, agonistas, antagonistas, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de iARN, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNmi, aptámeros, proteínas, vectores de terapia genética, vacunas de ADN, adyuvantes, moléculas coestimuladoras o combinaciones de los mismos.

En cualquiera de los métodos divulgados aquí, el compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede actuar de manera variada produciendo efectos de modulación de la expresión genética directa solos y/o en combinación con cualquier otro agente útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad o condición que no disminuya el efecto de modulación de la expresión genética del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención. En cualquiera de los métodos divulgados aquí, los agentes útiles para tratar o prevenir la enfermedad o condición incluyen, pero no se limitan a, vacunas, antígenos, anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, agentes citotóxicos, inhibidores de quinasa, alérgenos, antibióticos, moléculas de ARNsi, oligonucleótidos antisentido, antagonistas de TLR (por ejemplo, antagonistas de TLR3 y/o TLR7 y/o antagonistas de TLR8 y/o antagonistas de TLR9), agentes quimioterapéuticos (tanto de quimioterapia tradicional como de terapias direccionadas modernas), agentes terapéuticos direccionados, células activadas, péptidos, proteínas, vectores de terapia genética, vacunas peptídicas, vacunas proteínicas, vacunas de ADN, adyuvantes, y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, citoquinas, quimioquinas, ligandos de proteínas, factores transactivadores, péptidos que comprenden aminoácidos modificados), o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, se contempla que el compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede ser administrado en combinación con uno o más compuestos quimioterapéuticos, agentes terapéuticos direccionados y/o anticuerpos monoclonales. Alternativamente, el agente puede incluir vectores de ADN que codifican para el antígeno o alérgeno. Alternativamente, el compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede ser administrado en combinación con otros compuestos (por ejemplo lípidos o liposomas) para potenciar la especificidad o magnitud de la modulación de la expresión genética del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

En cualquiera de los métodos divulgados aquí, la administración de compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención, solos o en combinación con cualquier otro agente, puede ser por cualquier ruta adecuada, incluyendo,

sin limitación, parenteral, administración por mucosas, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, por pistola de genes, por parche dérmico o en forma de gotas para ojo o lavado bucal. La administración de las composiciones terapéuticas de los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo utilizando procedimientos conocidos usando una cantidad efectiva y durante períodos de tiempo efectivos para reducir los síntomas o subrogar los marcadores de la enfermedad. Por ejemplo, una cantidad efectiva de un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención para tratar una enfermedad y/o trastorno podría ser aquella cantidad necesaria para aliviar o reducir los síntomas, o retardar o mejorar un tumor, cáncer, o infección bacteriana, viral o fúngica. En el contexto de la administración de una composición que modula la expresión genética, una cantidad efectiva de un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención es una cantidad suficiente para alcanzar la modulación deseada en comparación con la expresión genética en ausencia del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención. La cantidad efectiva de cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o condición que está siendo tratada, el oligonucleótido particular que está siendo administrado, el tamaño del sujeto, o la severidad de la enfermedad o condición. Una persona de habilidad normal en el arte puede determinar empíricamente la cantidad efectiva de un oligonucleótido particular sin necesitar experimentación indebida.

Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica se administra preferiblemente en una dosificación suficiente para alcanzar un nivel en sangre del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención que va desde aproximadamente 0.0001 micromolar hasta aproximadamente 10 micromolar. Para administración localizada, concentraciones mucho más bajas que estas pueden ser efectivas, y pueden tolerarse concentraciones mucho más altas. Preferiblemente, una dosificación total del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención varía desde aproximadamente 0.001 mg por paciente por día hasta aproximadamente 200 mg por kilo de peso corporal por día. En ciertas realizaciones, la dosificación total puede ser 0.08, 0.16, 0.32, 0.48, 0.32, 0.64, 1, 10 o 30 mg/kg de peso corporal administrado diariamente, dos veces a la semana o semanalmente. Puede ser deseable administrar simultánea o secuencialmente una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más de las composiciones terapéuticas de la invención a un individuo en forma de un episodio de tratamiento individual.

Los métodos de acuerdo con este aspecto son útiles para estudios modelo de expresión genética. Los métodos también son útiles para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad humana o animal. Por ejemplo, los métodos son útiles para inhibición pediátrica y veterinaria de aplicaciones de expresión genética.

Los ejemplos a continuación pretenden ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1:

Preparación de compuestos basados en oligonucleótidos

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención fueron sintetizados químicamente utilizando química de fosforamidita en un sintetizador automatizado de ADN/ARN. Los monómeros de ARN 2'-O-TBDMS protegidos con TAC (excepto U), A, G, C y U, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los monómeros de 7-desaza-G, inosina y loxorribina fueron adquiridos de ChemGenes Corporation. El 5-etiltio-1H-tetrazol 0.25 M, PAC- anhídrido Cubierta A y Cubierta B fueron adquiridos de Glen Research. El ácido tricloroacético (TCA) al 3% en diclorometano (DCM) y el 3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido al 5% (reactivo de Beaucage) fueron hechos internamente.

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención fueron sintetizados a escala de 1-2 μ M utilizando un protocolo de síntesis de ARN estándar.

Escisión y desprotección de las bases

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención fueron escindidos a partir del soporte sólido y la solución fue calentada adicionalmente a 65°C para eliminar los grupos protectores de las exo aminas cíclicas. La solución resultante fue secada completamente en un SpeedVac.

Purificación por IE HPLC

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención fueron purificados por HPLC con intercambio iónico.

Columna: Columna Dionex ADNPac 100 (22X250)

Calentador de columna: Calentador de columna ChromTech TL-105 HPLC, temperatura fijada a 80°C.

Regulador A: Tris-HCL 20 mM, pH 7.0, acetonitrilo al 20%.

Regulador B: NaCl 3.0 M, Tris-HCL 20 mM, pH 7.0, acetonitrilo al 20%.

ES 2 538 347 T3

Rata de flujo: 10 ml/min

Gradiente:

0-2 min: 0% B

2-11 min: 0% B a 35% B

5 11-41 min: 35% B a 90% B

41-45 min: 100% B

10 La solución cruda de compuestos basados en oligonucleótidos de la invención fue inyectada en el HPLC. Se ejecuta el gradiente anterior y se recolectan las fracciones. Todas las fracciones que contienen más de 90% de producto deseado fueron mezcladas, y luego la solución fue concentrada hasta casi sequedad por RotoVap. Se agregó agua libre de ARNs para hacer un volumen final de 10 ml.

Desalado en C-18 en fase reversa

15 Un cartucho CC-18 Sep-Pak comprado de Waters fue acondicionado primero con 10 ml de acetonitrilo seguidos por 10 ml de acetato de sodio 0.5 M. Se cargaron 10 ml de la solución de compuestos basados en oligonucleótidos de la invención. Se utilizaron entonces 15 ml de agua para lavar la sal. Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención fueron eluidos con 1 ml de acetonitrilo al 50% en agua.

La solución se coloca en SpeedVac durante 30 minutos. La solución remanente fue filtrada a través de un filtro de 0.2 micrones y luego liofilizado hasta sequedad. El sólido fue redisolto entonces en agua para lograr la concentración deseada.

La solución final fue almacenada por debajo de 0°C.

20 Electroforesis capilar

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención fueron analizados por electroforesis capilar de acuerdo con las siguientes condiciones.

Instrumento: Beckman 5010

Capilar: Capilar 62 cm ssADN

25 Preparación de la muestra: 0.2 OD de composición basada en oligonucleótidos de acuerdo con la invención fueron disueltos en 200 µl de agua libre de ARNs

Inyección: Inyección electrocinética a 5KV durante 5 segundos.

Condiciones de ejecución: 14KV durante 50 minutos a 30 °C.

Análisis por HPLC con intercambio iónico

30 Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención fueron analizados por HPLC de intercambio iónico de acuerdo con las siguientes condiciones.

Columna: Guardacolumna Dionex ADNPac (22X250)

Calentador de columna: calentador de columna ChromTech TL-105 HPLC, con temperatura fijada a 80°C.

Regulador A: Tris-HCL 100 mM, pH 8.0, acetonitrilo al 20%.

35 Regulador B: LiCl 2.0 M, Tris-HCL 100 mM, pH 8.0, acetonitrilo al 20%.

Rata de flujo: 2 ml/min

Gradiente:

0-2 min: 0% B

2-10 min: 0% B a 100% B

40 10-15 min: 100%

Análisis por PAGE

Se cargaron 0.3 OD de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención sobre un gel de poliacrilamida al 20% y se ejecutó el análisis a potencia constante de 4 vatios durante aproximadamente 5 horas. El gel fue observado bajo luz UV de longitud de onda corta.

Ejemplo 2:

5 Aislamiento de PBMC humano

Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de sangre de voluntarios saludables recién extraída (CBR laboratorios, Boston, MA) fueron aisladas mediante el método de centrifugación por gradiente de densidad Ficoll (Histopaque-1077, Sigma).

Aislamiento de pDC humana

10 Las células dendríticas plasmacitoides humana (pDCs) fueron aisladas a partir de PBMCs de sangre de voluntarios humanos saludables recién obtenida por selección positiva utilizando los kits de aislamiento de células BDCA4 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tratamiento de PBMCs y pDCs

15 Las PBMCs humanas fueron sembradas en placas de 48 pozos utilizando 5×10^6 células/ml. Las pDCs fueron sembradas en placas de 96 pozos utilizando 1×10^6 células/ml. Los compuestos basados en oligonucleótidos de ejemplo de la invención, disueltos en DPBS (pH 7.4; Mediatech) fueron añadidos a los cultivos celulares a dosis de 0, 0.01, 1.0 o 10.0 $\mu\text{g/ml}$. Las células fueron incubadas entonces a 37°C durante 24 horas y estimuladas a continuación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de agonista de TLR9 durante 24 horas. Después del tratamiento y estimulación, los sobrenadantes fueron recolectados para los ensayos luminex multiplex o ELISA. En ciertos experimentos, los niveles de IFN- α , IL-6 y/o IL-12 fueron medidos por ELISA en sándwich. Los reactivos requeridos, incluyendo los anticuerpos y estándares de citoquina, fueron adquiridos de PharMingen.

Ensayo en células B humanas para actividad antisentido de TLR9

Las células B humanas fueron aisladas de PBMCs por selección positiva utilizando el kit de aislamiento celular CD19 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 El medio de cultivo utilizado para el ensayo consistió de medio RPMI 1640, suplementado con glutamina 1.5 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 50 μM , mezcla de penicilina-estreptomicina de 100 IU/ml y suero bovino fetal inactivado por calor al 10%.

30 Un total de 0.5×10^6 células B por ml (esto es $1 \times 10^5/200 \mu\text{l/pozo}$) fueron incubadas en placas de fondo plano de 96 pozos con 50 $\mu\text{g/ml}$ de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención durante 24 horas. Después de 24 horas, las células fueron estimuladas con agonista de TLR9 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas. Después del tratamiento y estimulación se prepararon los extractos celulares y se analizaron en cuanto a la cantidad de ARNm de TLR9.

Ensayos de cultivo de células HEK293 para la actividad antisentido de TLR9 o TLR7

35 Células HEK293 que expresan TLR9 o TLR7 de ratón de manera estable (Invivogen, San Diego, CA) fueron sembradas en placas de 48 pozos en DMEM de 250 μL /pozo suplementado con FBS al 10% inactivado por calor en una incubadora de CO_2 al 5%. En una confluencia de 80%, los cultivos fueron transfectados de manera transiente con 400 ng/mL de la forma secretada de plásmido informador de fosfatasa alcalina embrionaria humana (SEAP) (pNifty2-Seap) (Invivogen) en la presencia de 4 $\mu\text{L/mL}$ de lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) en medio de cultivo. El ADN de plásmido de la lipofectamina fueron diluidos separadamente en medio libre de suero e incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, el ADN y la lipofectamina fueron mezclados y las mezclas fueron incubadas adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se agregaron alícuotas de 25 μl de la mezcla ADN/lipofectamina que contenían 100 ng de plásmido de ADN y 1 μL de lipofectamina a cada pozo de la placa de cultivo celular, y las células fueron transfectadas durante 6 horas. Después de la transfección, el medio fue reemplazado con un medio de cultivo fresco (sin antibióticos) y se agregaron 0, 0.01, 1 o 10 $\mu\text{g/ml}$ de compuestos basados en oligonucleótidos específicos para TLR9 o TLR7, y la incubación continuo durante 24 horas. Después del tratamiento antisentido, las células fueron estimuladas con el agonista de TLR9 o TLR7 a 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas.

Al final del tratamiento y estimulación, se tomaron 20 μl del sobrenadante de cultivo de cada pozo y se ensayaron en cuanto a la prueba SEAP mediante el método Quanti Blue de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invivogen). Los datos se muestran como un incremento en veces en la actividad de NF- κB sobre el control de PBS.

Ensayos de cultivo de células HEK293 para actividad de TLR7, TLR8 u otro antisentido objetivo de ARN específico

Para determinar la actividad de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir TLR7 o TLR8 o cualquier otro objetivo de ARN específico, se seguiría el siguiente procedimiento. Las células HEK293 que expresan de manera estable TLR7 o TLR8 de ratón u otro objetivo de ARN específico (Invivogen, San Diego, CA) fueron sembradas en placas de 48 pozos a 250 μ L/pozo de DMEM suplementado con FBS al 10% inactivado por calor en una incubadora de CO₂ al 5%. A 80% de confluencia, los cultivos fueron transfectados de manera transiente con 400 ng/mL de la forma secretada del plásmido reportador de fosfatasa alcalina embrionaria humana (SEAP) (pNifty2-Seap) (Invivogen) en la presencia de lipofectamina 4 μ L/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA) en medio de cultivo. El ADN del plásmido y la lipofectamina serían diluidos separadamente en medio libre de suero e incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, el ADN diluido y la lipofectamina serían mezclados y las mezclas serían incubadas adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se agregarían alícuotas de 25 μ l de la mezcla ADN/lipofectamina que contienen 100 ng de ADN de plásmido y 1 μ L de lipofectamina a cada pozo de la placa de cultivo celular, y las células serían transfectadas durante 6 horas. Después de la transfección, se reemplazaría el medio con medio de cultivo fresco (sin antibióticos) y se agregarían 0, 0.01, 1 o 10 μ g/ml de oligonucleótidos antisentido específicos de acuerdo con la invención a los pozos, y la incubación continuaría durante 24 horas. Después del tratamiento antisentido, las células serían estimuladas con el agonista del objetivo hasta por 24 horas.

Al final del tratamiento y estimulación, se tomarían 20 μ l del sobrenadante del cultivo de cada pozo y se ensayarían con el ensayo SEAP por el método Quanti Blue de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invivogen). Los datos serían mostrados como un incremento en veces en la actividad de NF- κ B sobre el control de PBS.

Ensayo de células J774 murínicas en cuanto a la actividad antisentido de TLR9

Células de macrófago de J774 murínico (American Type Culture Collection, Rockville, MD) fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco complementados con suero bovino fetal al 10% (v/v) (FBS) y antibióticos (100 IU/ml de penicilina G/100 μ g/ml de estreptomycin). Las células J774 fueron sembradas a una densidad de 5×10^6 células/pozo en placas de seis pozos. Para los experimentos dependientes de la dosis, las células J774 fueron tratadas con 0.1, 10, 50 o 100 μ g/ml de compuestos basados en oligonucleótidos específicos para TLR9 de la invención y la incubación continuo durante 24 horas. Para los experimentos que determinaron los efectos sobre el ARN, las células J774 fueron tratadas con 0, 1 o 3 μ g/ml de compuestos basados en oligonucleótidos específicos para TLR9 de la invención u oligonucleótidos de control y la incubación continuo durante 48 horas. Para experimentos que determinan los efectos sobre las proteínas, las células J774 fueron tratadas con 0, o 50 μ g/ml de compuestos basados en oligonucleótidos específicos para TLR9 de la invención u oligonucleótidos de control y la incubación continuo durante 48 horas. Después del tratamiento antisentido, se prepararon extractos celulares y se analizaron en cuanto a la cantidad de ARNm de TLR9 o proteína de TLR9.

Ensayo de células HeLa para la actividad antisentido de VEGF

Se sembraron 5×10^6 células HeLa (ATCC, Manassas, VA) en una placa de cultivo de 12 pozos en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Mediatech, Manassas, VA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Mediatech, Manassas, VA). Para la transfección celular, se mezclaron 5 μ l de lipofectamina[®] 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 5 μ g de oligonucleótidos antisentido en 100 μ l de DMEM sin suero y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células fueron lavadas una vez con DMEM y se agregaron 100 μ l de complejos lipofectamina/oligonucleótido a 900 μ l de DMEM sin suero seguido por 2 horas de incubación a 37°C con CO₂ al 5%. Un grupo de solo lipofectamina sirvió como control. El medio fue cambiado entonces a DMEM con FBS al 10% y se incubó durante 24 horas. Después de la incubación durante 24 horas, se aisló el ARN total utilizando un mini kit QIAGEN RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA) de acuerdo con las sugerencias del fabricante. Se utilizó 1 μ g de ARN para transcribir de manera reversa al ADNc utilizando un kit High Capacity cADN Reverse Transcription (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para un PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR), se adquirieron cebadores y sondas para VEGF (catálogo no. Hs00900057_ml) y GAPDH (Hs99999905_ml) de Applied Biosystems. Se utilizaron 50 ng de ADNc en el qPCR con Taqman[®] Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y las reacciones fueron ejecutadas en un Applied Biosystems StepOnePlus[™] Real-Time PCR System de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se presentan en la figura 8D como la cantidad relativa de ARNm con respecto a células tratadas con lipofectamina utilizando el método $\Delta\Delta$ CT, en donde $\Delta\Delta$ CT = CT_{VEGF} - CT_{GAPDH} y $\Delta\Delta$ CT = Δ CT_{oligonucleótido} - Δ CT_{lipofectamina}. Cada barra representa 2-3 experimentos separados.

Ensayo con células de esplenocito de ratón C57BL/6 para actividad antisentido de TLR9

Las células de bazo de ratones C57BL/6 de 4 a 8 semanas de edad fueron cultivadas en medio RPMI completo. Las células de bazo de ratón fueron sembradas en placas de 24 pozos utilizando 5×10^6 células/ml, tratadas con compuestos basados en oligonucleótidos específicos para TLR9 de la invención disueltos en regulador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM), e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Después del tratamiento antisentido, las células fueron estimuladas con agonista de TLR9 10 μ g/ml durante 24 horas. Después del tratamiento y estimulación, los

sobrenadantes fueron recolectados y la secreción de IL-12 e IL-6 en los sobrenadantes del cultivo celular fueron medidos por ELISA en sándwich.

Ejemplo 3:

Actividad *in vivo* de composiciones basadas en oligonucleótidos

5 Para establecer la actividad *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, se inyectaron ratones hembras C57BL/6 de 5-6 semanas de edad (N = 3/grupo) con composiciones basadas en oligonucleótidos de ejemplo de acuerdo con la invención a 0.25, 2, o 5 mg/kg, o PBS, subcutáneamente en el flanco izquierdo. Veinticuatro horas después de la administración de las composiciones basadas en oligonucleótidos, los ratones fueron inyectados con 0.25 mg/kg de un agonista de TLR por vía subcutánea en el flanco derecho. Dos horas después de la administración del
10 agonista de TLR, se recolectó sangre y la concentración de IL-12 en suero fue determinada por ELISA. Los datos se muestran como concentraciones de IL-12 absolutas o como porcentaje de la producción de IL-12.

Duración de la actividad *in vivo* de las composiciones basadas en oligonucleótidos

Para establecer la duración de la actividad *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, se inyectaron ratones C57BL/6 hembra de 5-6 semanas de edad (N = 3/grupo) con composiciones basadas en oligonucleótidos de ejemplo de acuerdo con la invención a 5 mg/kg, o PBS, subcutáneamente en el flanco izquierdo. Veinticuatro horas después de la administración de las composiciones basadas en oligonucleótidos, los ratones fueron inyectados con 0.25 mg/kg de un agonista de TLR por vía subcutánea en el flanco derecho en los días 1, 3, 5, 7, 10 o 14. Dos horas después de cada administración del agonista de TLR, se recolectó sangre y se determinó la concentración de IL-12 por ELISA. Los datos se muestran como concentraciones de IL-12 absolutas o como porcentaje de la producción de IL-12.
15
20

Ejemplo 4:

Enlazamiento y escisión selectivos de compuestos basados en oligonucleótidos por proteínas enzimas asociadas antisentido

25 Para establecer la especificidad por las proteínas y enzimas asociadas antisentido para enlazar y escindir compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención u oligonucleótidos de control, se trataron como sigue: El ARNm objetivo marcado en el extremo 5' con [γ -32P] (por ejemplo SED ID NO. 21; 10 nM de TLR7 humano/ratón) y ARN o ADN complementarios (10 nM; TLR7 humano/ratón) en 30 ml de regulador (10 X regulador, Invitrogen) fueron calentados a 85°C durante 5 minutos, y luego enfriados hasta temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la fusión de las dos cadenas. La enzima cortadora humana (0.025 U, Invitrogen) fue agregada a la solución de reacción, y luego se incubó a 37°C durante 1 hora. Se agregaban a la muestra 1 ml de solución de detención (Invitrogen) y 10 ml de colorante de carga de gel a una solución de muestra y se mezcló bien. La mezcla fue congelada inmediatamente a -80°C. Los productos de digestión del ARN fueron analizados en PAGE desde naturalización al 16% y el gel fue expuesto a película de rayos X y se desarrollaron los autorradiogramas. Los resultados se muestran en la figura 13.
30

35

Reivindicaciones

1. Un compuesto sintético basado en oligonucleótidos que comprende dos oligonucleótidos que son complementarios a una secuencia de ARN de cadena sencilla, en donde los oligonucleótidos están enlazados en sus extremos 5', de tal manera que el compuesto basado en oligonucleótidos tiene dos extremos 3' accesibles y el compuesto basado en oligonucleótidos hibrida específicamente a e inhibe la expresión de la secuencia de ARN de cadena sencilla.
2. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde los oligonucleótidos tienen independientemente 15 a 40 nucleótidos de longitud.
3. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde los oligonucleótidos están enlazados uno a otro a través de un enlace nucleotídico o a través de un enlazante no nucleotídico.
4. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde los oligonucleótidos comprenden uno o más ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, ácidos nucleicos asegurados, nucleótidos de arabinosa o una combinación de los mismos.
5. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde al menos uno de los oligonucleótidos está modificado.
6. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 5, en donde el oligonucleótido modificado tiene al menos un enlace de internucleótidos seleccionado del grupo consistente de alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, y un enlazante no nucleotídico.
7. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 5, en donde el oligonucleótido modificado comprende al menos un nucleótido sustituido en 2'-O- seleccionado del grupo consistente de 2'-O-metilo, 2'-O-metoxi, 2'-O-etoxi, 2'-O-metoxietilo, 2'-O-alquilo, 2'-O-arilo o 2'-O-alilo.
8. Una composición que comprende un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
9. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la inhibición de expresión genética.
10. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9, en donde los oligonucleótidos son complementarios a un ARN que codifica Bcl-2, EGFR, msm2, MyD88, PCSK9, survivina, VEGF o un TLR.
11. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el TLR es seleccionado de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR9.
12. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9, en donde cada uno de los oligonucleótidos es complementario a una región diferente de la secuencia de ARN de cadena sencilla.
13. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método para tratar terapéuticamente un mamífero que tiene una enfermedad o trastorno mediados por una proteína, en donde los oligonucleótidos son complementarios del ARN de cadena sencilla que codifica la proteína.
14. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método para prevenir una enfermedad o trastorno mediados por una proteína de un mamífero en riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno, en donde los oligonucleótidos son complementarios al ARN de cadena sencilla que codifica la proteína.
15. El compuesto basado en oligonucleótidos de las reivindicaciones 13 o 14, en donde la enfermedad o trastornos son seleccionados de cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos de la piel, alergia, asma, infección bacteriana, viral o fúngica, o una enfermedad causada por un patógeno.
16. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, el cual es administrado en conjunción con una o más vacunas, antígenos, anticuerpo, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, agonistas de TLR, antagonistas de TLR, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNm, oligonucleótidos antisentido, aptámeros, proteínas, péptidos, vectores de terapia genética, vacunas de ADN, adyuvantes, antagonistas de actividad proteínica, inhibidores de quinasa, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos direccionados, moléculas coestimuladoras o combinaciones de los mismos.

5 17. La composición de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende adicionalmente una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, inhibidores de quinasa, alérgenos, antibióticos, agonistas, antagonistas, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de iARN, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNm, aptámeros, proteínas, vectores de terapia genética, vacunas de ADN, adyuvantes, moléculas coestimuladoras o combinaciones de los anteriores.

Figura 1A

Síntesis Lineal de Oligonucleótidos

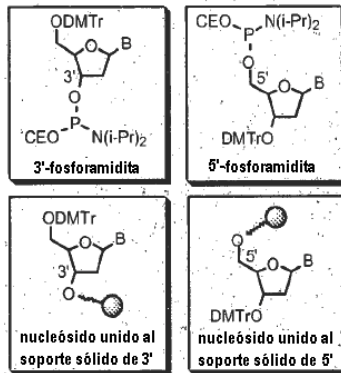
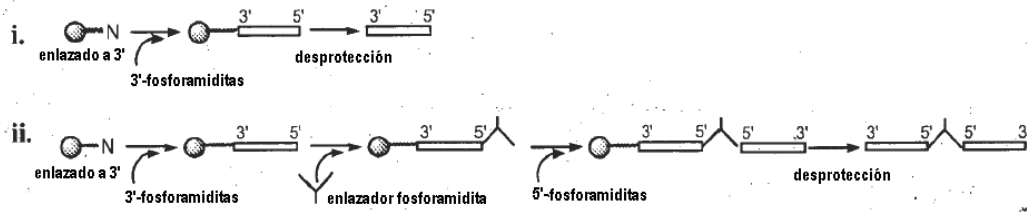


Figura 1B

Síntesis en Paralelo de Oligonucleótidos

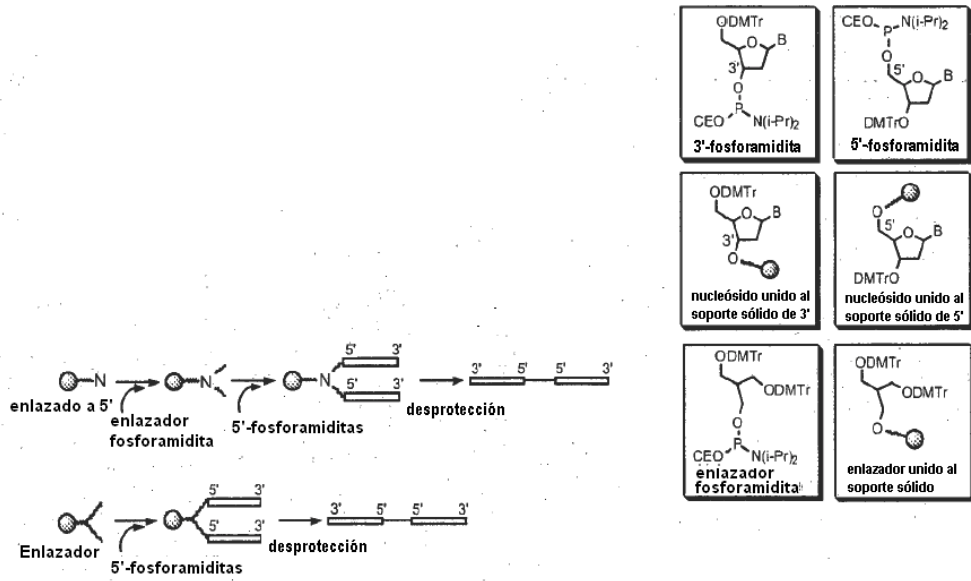


Figura 2A
Inhibición de la Actividad de TLR9

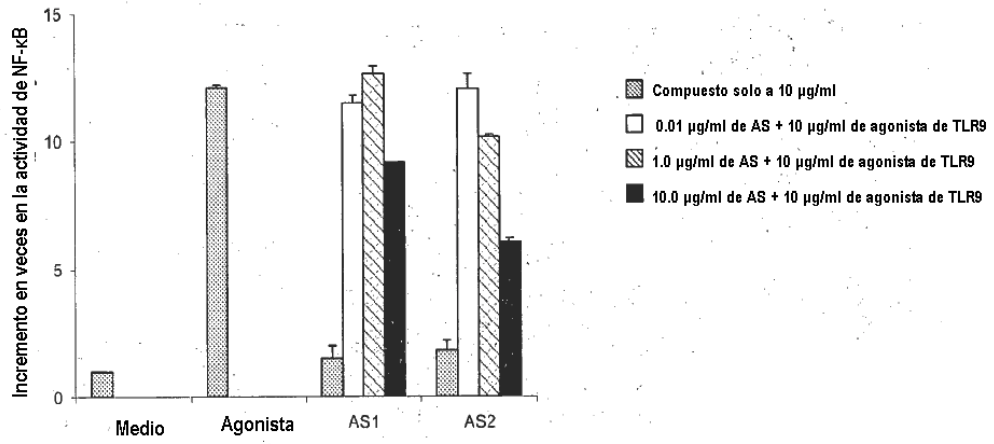


Figura 2B

Inhibición de la Actividad de TLR9

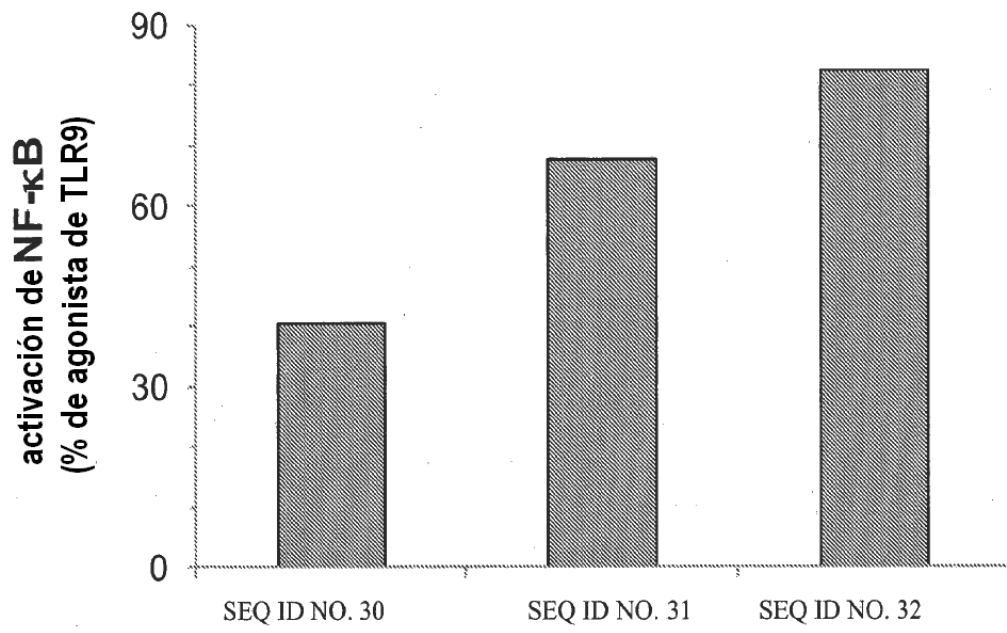


Figura 2C

Inhibición de la actividad de TLR7

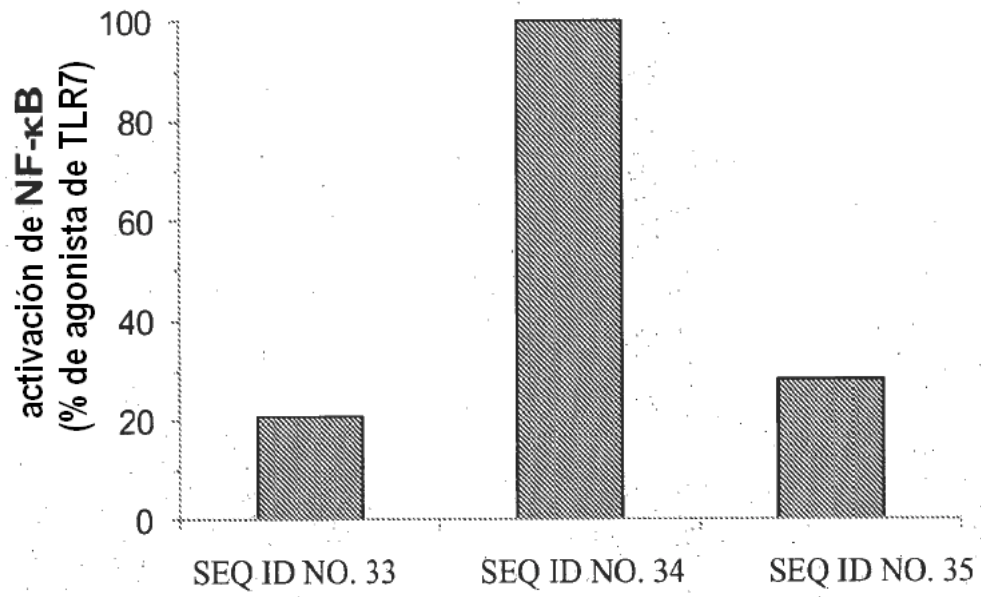


Figura 2D

Inhibición de la Actividad de MyD88

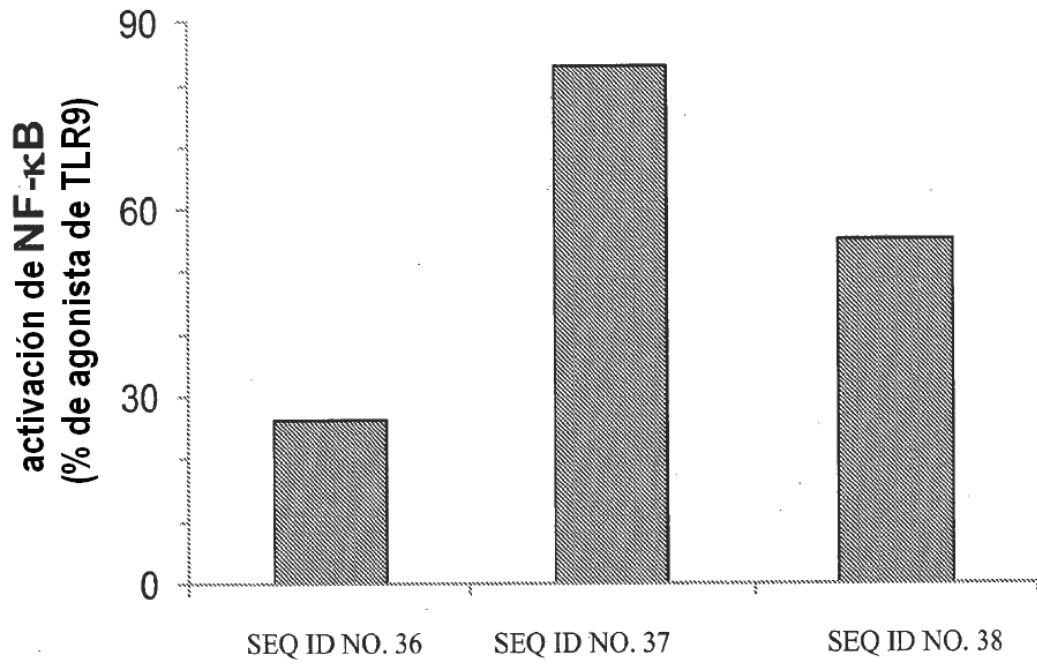


Figura 3

Inhibición de la Expresión de TLR9

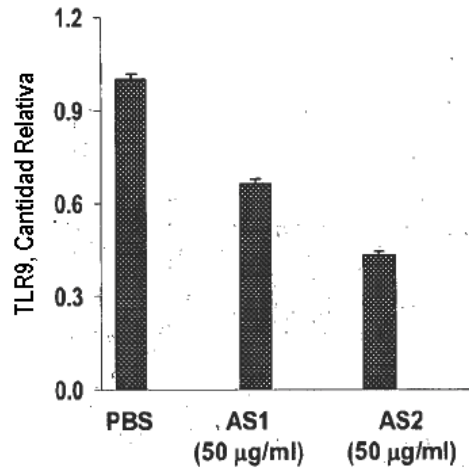


Figura 4
Inhibición de la Expresión de TLR9

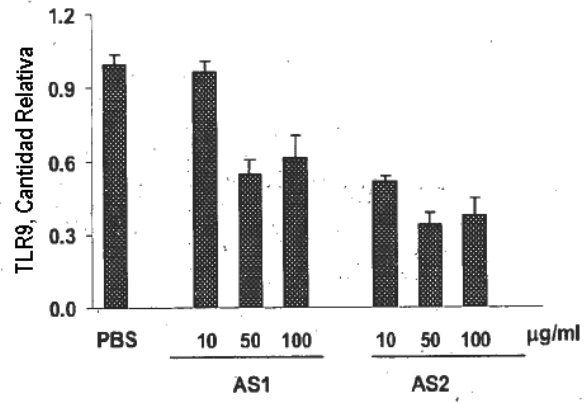


Figura 5A

Inhibición In Vivo de la Expresión y Actividad de TLR9

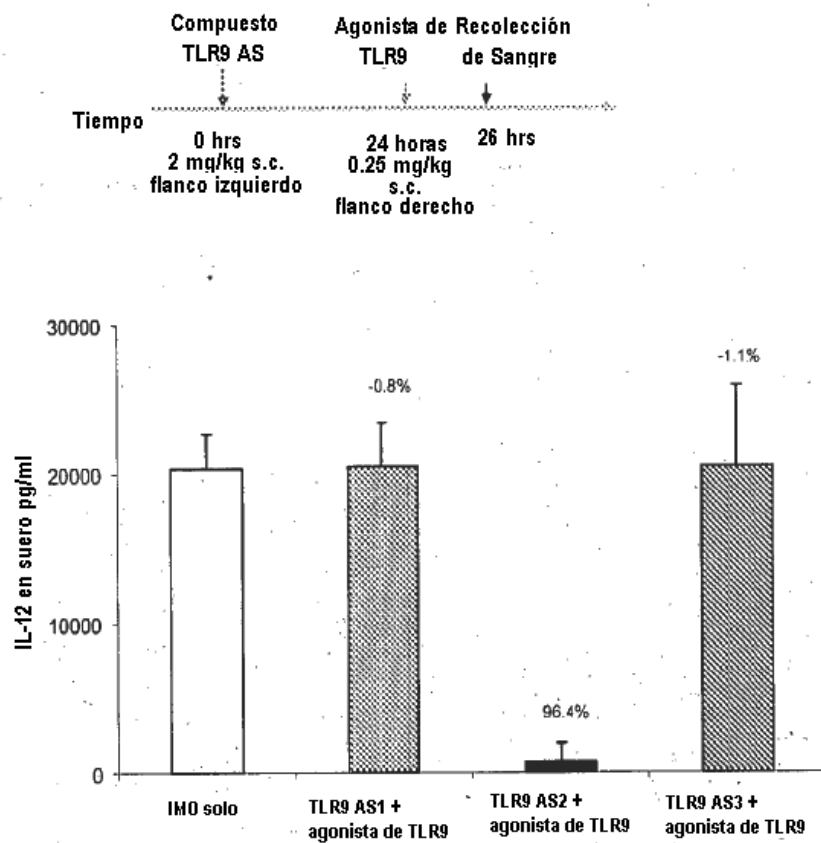


Figura 5b

Inhibición In Vivo de la Expresión y Actividad de TLR9

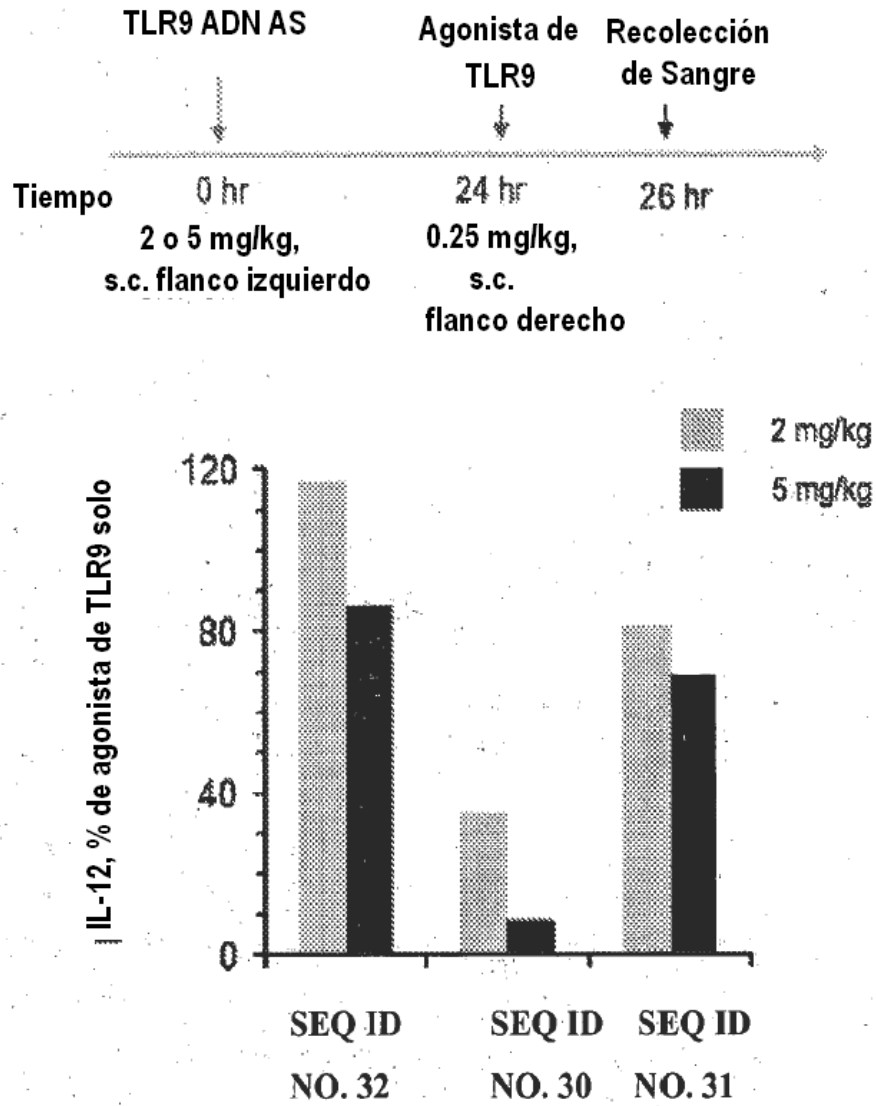


Figura 5C

Duración de la Inhibición In Vivo de la Actividad de MyD88

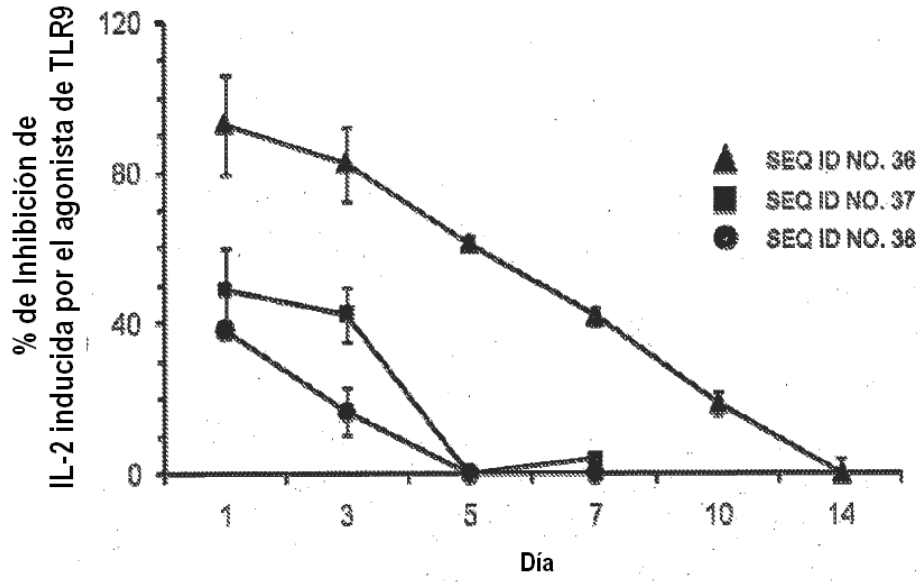


Figura 6
Inhibición In Vivo de la Expresión y Actividad de TLR9

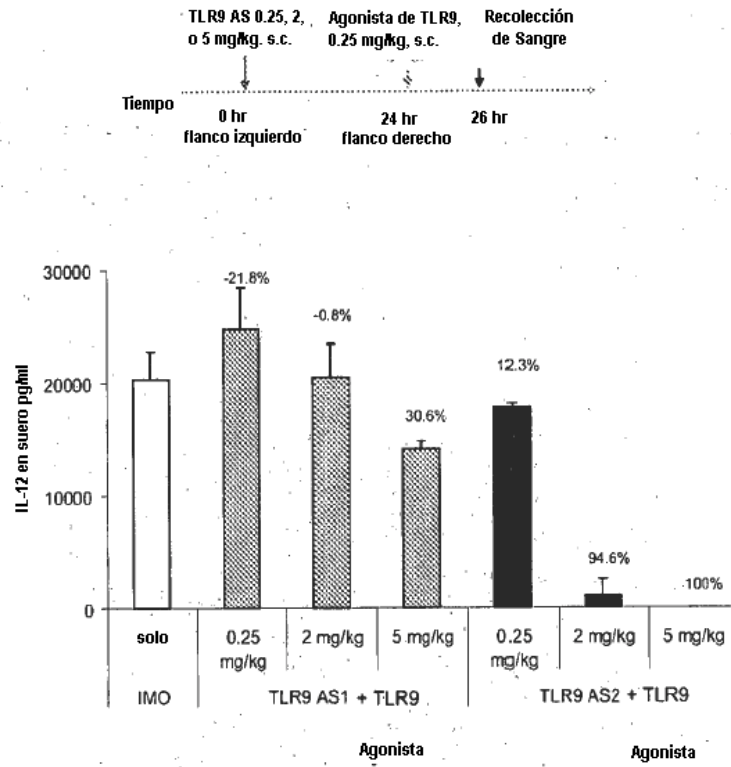


Figura 7

Inhibición In Vivo de la Expresión y Actividad de TLR9

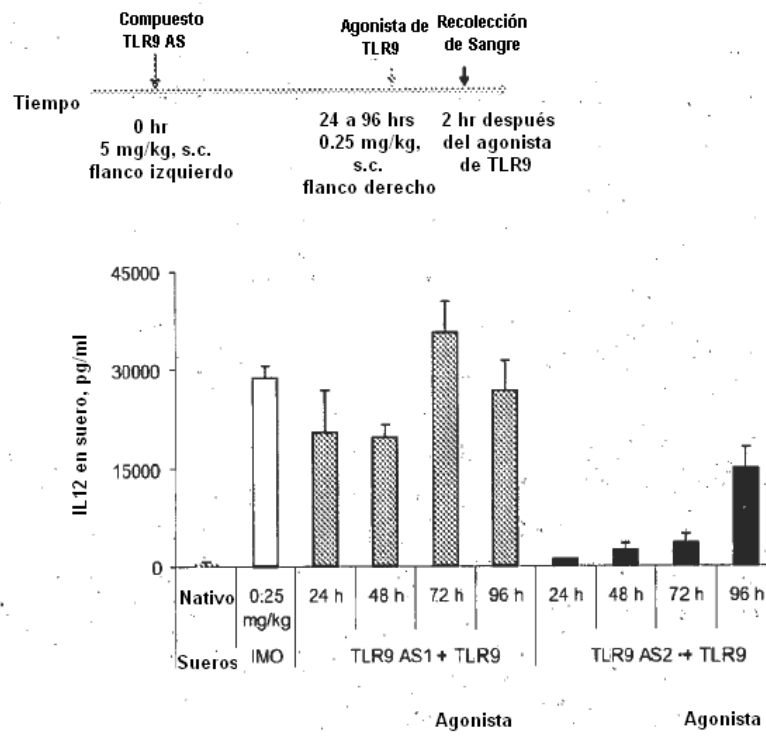


Figura 8A

Inhibición de la Expresión de ARNm de TLR9

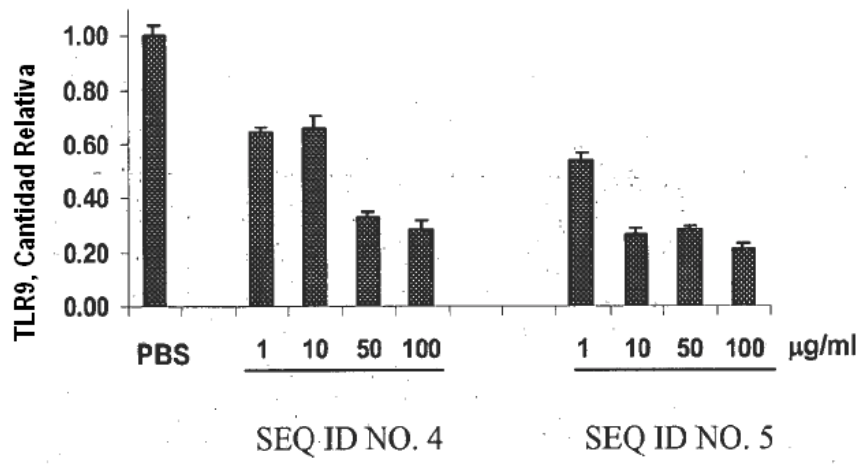


Figura 8B

Inhibición de la Expresión de ARNm de TLR9

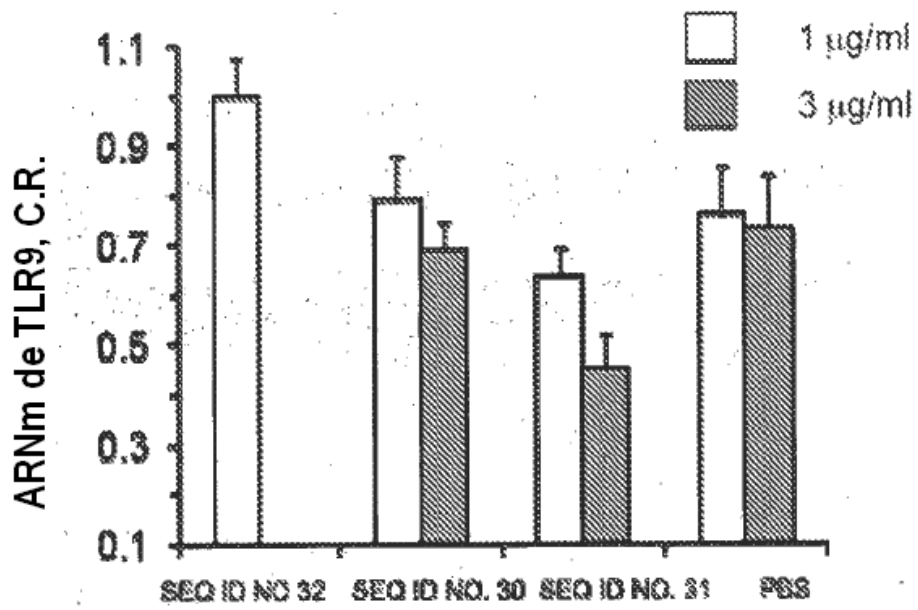


Figura 8C
Inhibición de la Expresión de Proteína TLR9

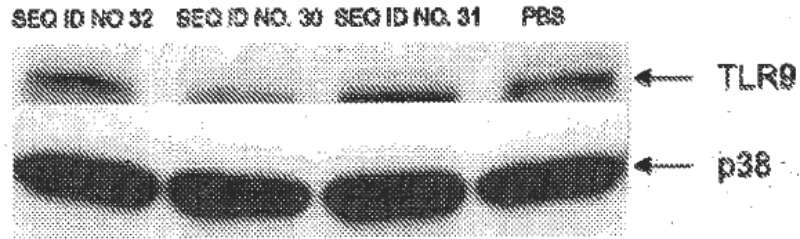


Figura 8D
Inhibición de la Expresión de ARNm de VEGF

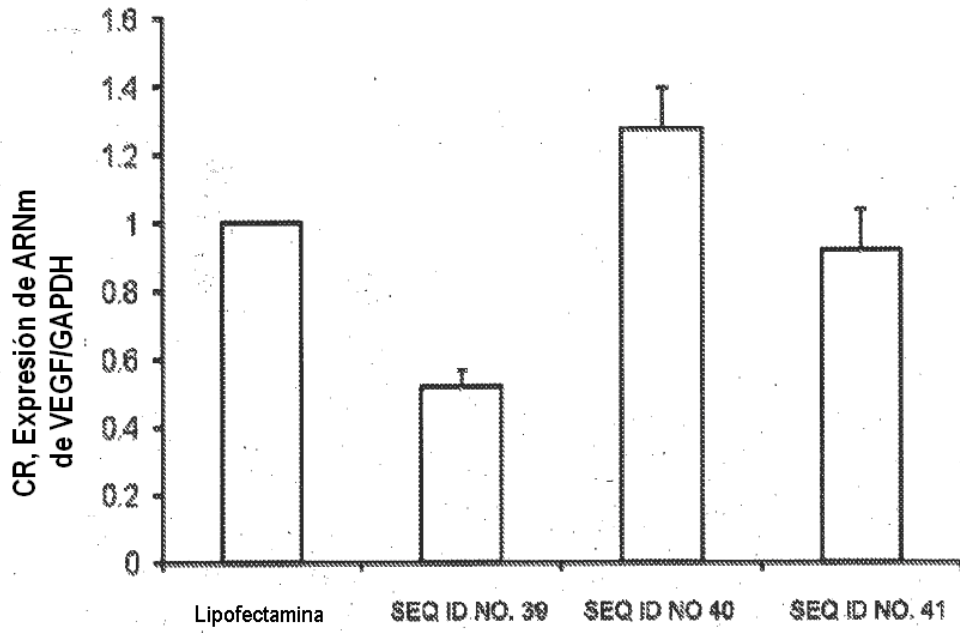


Figura 9
Inhibición de la Expresión de TLR9

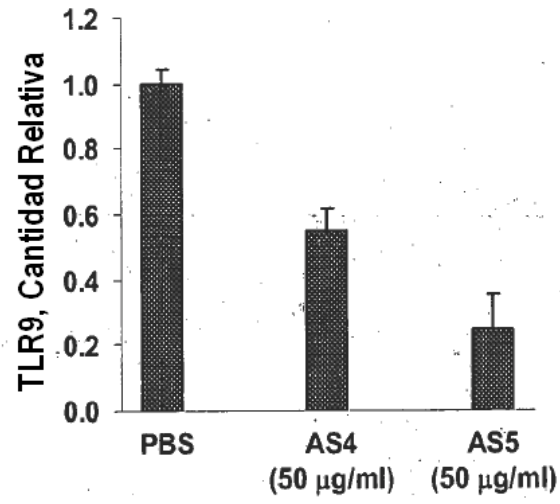


Figura 10

Inhibición de la Expresión de TLR9

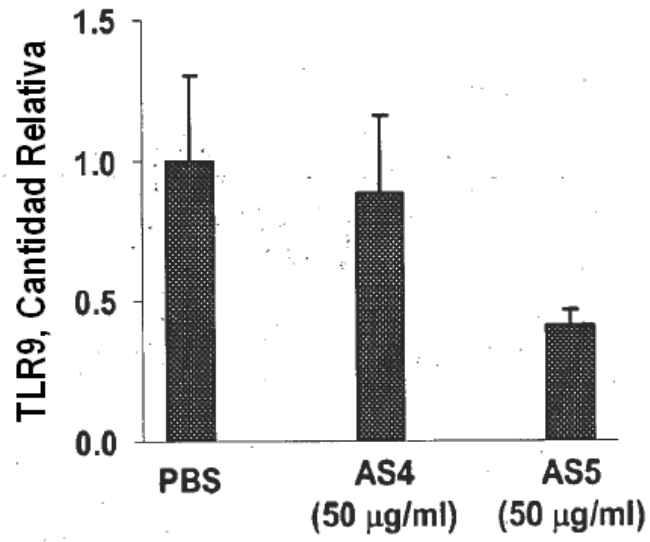


Figura 11
Inhibición In Vivo de la Expresión y Actividad de TLR9

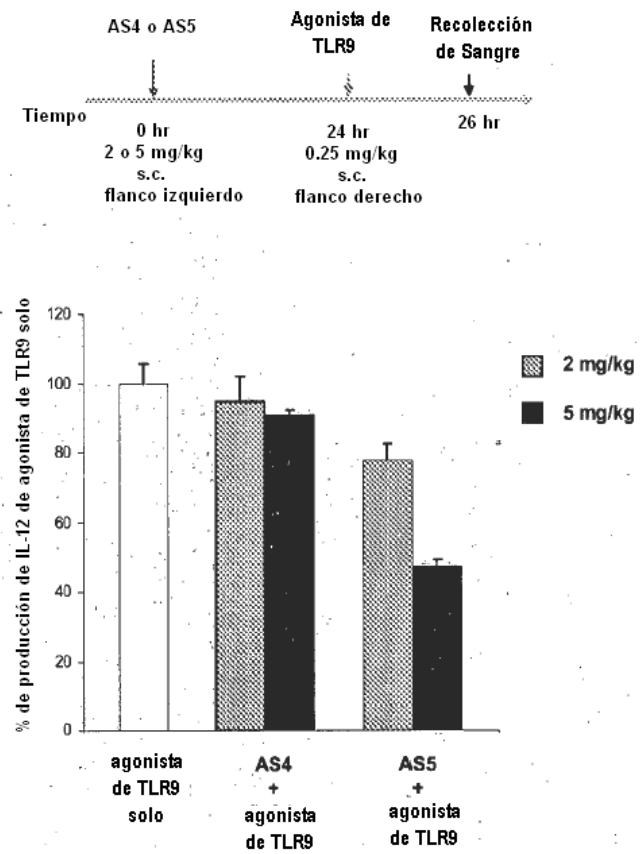


Figura 12
Inhibición de la Expresión y Actividad de TLR7

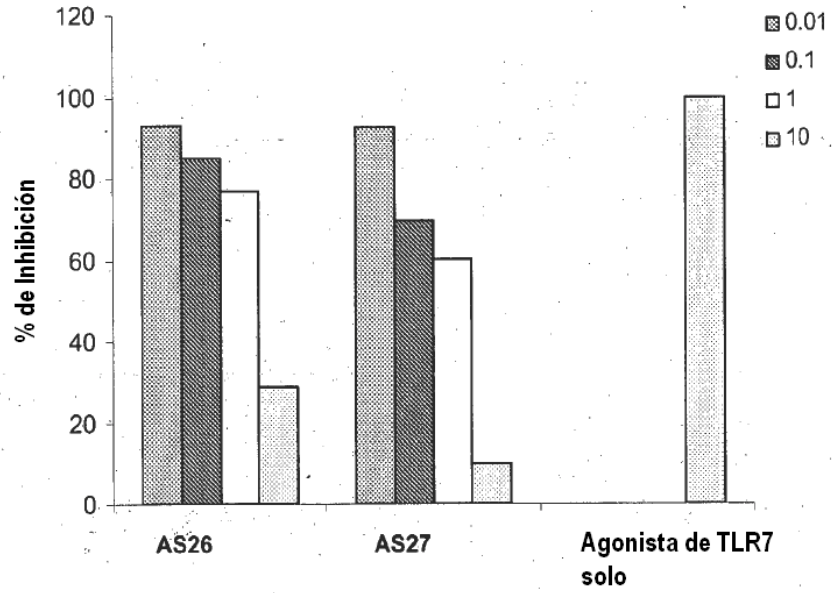


Figura 13
Enlazamiento y Escisión Selectivos de Compuestos Basados en Oligonucleótidos de Acuerdo con la Invención por
Proteínas Asociadas con Inhibición Mediada por Antisentido de la expresión Genética

