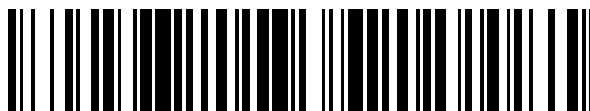


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 782**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2009 E 09825063 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2350283**

54 Título: **Compuestos y métodos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del SNC**

30 Prioridad:

04.11.2008 US 111287 P

04.11.2008 SE 0802339

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

22.02.2016

73 Titular/es:

INDEX PHARMACEUTICALS AB (100.0%)

Tomtebodavägen 23 A

171 77 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

BANDHOLTZ, LISA CHARLOTTA;

GIELEN, ALEXANDER;

ZARGARI, AREZOU;

VON STEIN, OLIVER y

AXELSSON, LARS-GÖRAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 560 782 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

Compuestos y métodos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del SNC

La presente invención se refiere al tratamiento y/o alivio de enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC), tal como, pero sin limitarse a ella, la esclerosis múltiple, y da a conocer los compuestos y los métodos para este uso.

Antecedentes

La migración celular es decisiva para muchos procesos del cuerpo humano, tales como la respuesta inmunitaria, pero también puede ser un componente de la inflamación crónica. La migración de las células mononucleares al SNC se cree que es un factor que subyace a la patogenia de las enfermedades inflamatorias del SNC.

Un ejemplo es la esclerosis múltiple (EM), que es una enfermedad autoinmunitaria que afecta al SNC, a saber, el cerebro y la médula espinal. La EM se caracteriza por debilidad, temblores y deficiencias visuales. Otros síntomas son habla titubeante y trastornos de la movilidad, p. ej., que los pacientes arrastran los pies, tropiezan y se les caen los objetos con frecuencia. Estos síntomas pueden mantenerse leves, ir y venir, o volverse incapacitantes, pero tienden a empeorar progresivamente con la edad (Hafler, 2004). La EM suele afectar más a las mujeres que a los hombres. Lo más habitual es que el trastorno comience entre los 20 y los 40 años, pero puede golpear a cualquier edad. Se desconoce la causa exacta, pero se cree que la EM se debe a la lesión de la vaina de mielina, el material protector que rodea las células nerviosas. Es una enfermedad progresiva, lo que significa que el daño empeora con el tiempo. La inflamación destruye la mielina, lo que deja numerosas áreas con tejido cicatricial (esclerosis). La inflamación se produce cuando las propias células inmunitarias del cuerpo atacan al sistema nervioso.

Una etapa importante de la patogenia de la EM es la migración de las células al SNC, en donde los linfocitos T autorreactivos y los linfocitos B junto con los monocitos intervienen en la inflamación del SNC, con lo que se produce la desmielinización de los axones. Se ha propuesto que las quimiocinas y sus receptores desempeñan una función importante en la atracción de estos leucocitos al SNC. Así pues, para impedir la migración de las células destructivas al SNC, puede resultar una estrategia eficaz una reducción de los receptores de las quimiocinas. Los receptores de las quimiocinas importantes descritos en la enfermedad de la EM son el CCR5 (un receptor de proteínas quimiotácticas, tales como RANTES y MIP-1 α), CXCR3 (un receptor de proteínas quimiotácticas, tales como IP-10 y MIG) y CCR2 (un receptor de proteínas quimiotácticas, tales como MCP1-3) (Trebst C. et al., 2009).

Otra etapa que puede hacer que los linfocitos entren en el parénquima del SNC es la adhesión de CD49d (antígeno muy tardío, VLA-4, expresado en los linfocitos T y en los linfocitos B) a sus receptores en las células endoteliales y, con ello, que atraviesen la barrera hematoencefálica. Una reducción de CD49d puede reducir la trans migración y la acumulación de las células inmunitarias al SNC (Steinman L., 2009).

En los individuos sanos, las células inmunitarias no pueden atravesar los capilares y las vénulas desde el SNC al propio tejido del SNC porque las paredes de los capilares del SNC son diferentes de las del resto del cuerpo por el hecho de tener las células muy empaquetadas, de manera que no permiten el paso de las células inmunitarias. Esta característica especial del aparato vascular del SCN se denomina la barrera hematoencefálica (BHE). El factor del crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se ha descrito que induce la rotura de la BHE, lo que a su vez exacerba la respuesta inflamatoria de la enfermedad autoinmunitaria del SNC (p. ej., EM) (Proescholdt M. A. et al., 2002). Una reducción del VEGF es una estrategia eficaz para impedir que se incremente la permeabilidad vascular de la BHE y con ello se reduce la afluencia de las células destructivas al SNC.

La inflamación hace que se enlentezcan o se bloqueen los impulsos nerviosos, lo que conduce a los síntomas de la EM. Se pueden repetir los episodios, o exacerbaciones, de inflamación a lo largo de cualquier región del cerebro y de la médula espinal.

Los síntomas varían porque varía la localización y la extensión de cada crisis. Normalmente, los episodios que duran días, semanas o incluso meses, se alteran con periodos de reducción de los síntomas o sin ningún síntoma (remisión). La recurrencia (recidiva) ocurre con frecuencia, aunque también se puede producir la progresión continua sin periodos de remisión.

Los pacientes diagnosticados con EM se espera que pasen por una de las cuatro evoluciones clínicas de la enfermedad, cada una de las cuales puede ser leve, moderada o grave:

1. Recidiva-remisión

Características: las personas con este tipo de EM experimentan reagudizaciones claramente definidas (también denominadas recidivas, crisis o exacerbaciones). Son episodios de empeoramiento agudo de la función neurológica. Les siguen periodos de recuperación parcial o completa (remisiones) sin progresión de la enfermedad.

Frecuencia: la forma más habitual de EM en el momento del diagnóstico inicial. Aproximadamente el 85% de los pacientes.

2. Primaria-progresiva

5 Características: las personas con este tipo de EM experimentan un lento, pero casi continuo, empeoramiento de la enfermedad desde el comienzo, sin ninguna recidiva ni remisión clara. Sin embargo, hay variaciones de las tasas de progresión con el tiempo, periodos de estabilización ocasionales y mejoras menores temporales.

Frecuencia: relativamente infrecuente. Aproximadamente el 10% de los pacientes.

3. Secundaria-progresiva

10 Características: las personas con este tipo de EM experimentan un periodo inicial de EN en recidiva-remisión, seguido de una evolución de la enfermedad con empeoramiento continuo con o sin exacerbaciones ocasionales, recuperaciones menores (remisiones) o periodos de estabilización.

15 Frecuencia: el 50% de las personas con EM en recidiva-remisión desarrollaron esta forma de enfermedad en el plazo de 10 años desde el diagnóstico inicial, antes de la introducción de los fármacos «modificadores de la enfermedad». No se dispone todavía de datos a largo plazo que demuestren si hay un retraso significativo con el tratamiento.

4. Progresiva-recidivante

20 Características: las personas con este tipo de EM experimentan una enfermedad que empeora continuamente desde el comienzo, pero también tienen recidivas agudas claras (crisis o exacerbaciones), con o sin recuperación. A diferencia de la EM en recidiva-remisión, los periodos entre las recidivas se caracterizan por una progresión continua de la enfermedad.

Frecuencia: relativamente infrecuente. Aproximadamente el 5% de los pacientes.

25 Dentro de la comunidad científica no hay consenso sobre qué es lo que desencadena una crisis. Los pacientes con EM tienen típicamente más células inmunitarias que una persona sana, lo que sugiere que podría intervenir una respuesta inmunitaria. Las teorías más habituales apuntan a un virus o a defecto genético, o a una combinación de ambos. También parece haber una conexión genética con la enfermedad. La EM es más probable que se produzca en el norte de Europa, el norte de los Estados Unidos, en el sur de Australia y en Nueva Zelanda que en otras regiones. Los estudios geográficos indican que puede estar implicado un factor medioambiental. Las personas con antecedentes familiares de EM y las que viven en un área geográfica con una mayor tasa de incidencia para la EM tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad.

30 Las medicaciones, tales como el interferón β , el acetato de glatirámico y la mitoxantrona pueden reducir la frecuencia y la intensidad de las crisis en las personas con EN en recidiva-remisión y podrían reducir o retrasar la futura incapacidad. El interferón β y la mitoxantrona también podrían enlentecer la progresión de la EM secundaria progresiva.

35 El tratamiento con el interferón β o el acetato de glatirámico debe comenzar tan pronto como se diagnostique la EM en recidiva-remisión. La mayoría de los especialistas están ahora de acuerdo en que el daño permanente al sistema nervioso se puede producir muy pronto, incluso mientras los síntomas son todavía bastante leves. El tratamiento precoz podría ayudar a impedir o retrasar parte de este daño.

40 Sin embargo, el tratamiento con el interferón β viene acompañado de varias reacciones adversas. Las reacciones adversas más frecuentes son síntomas similares a la gripe: incremento de la temperatura corporal, sensación de enfermedad, cansancio, cefalea, dolor muscular, convulsiones, mareos, cabello ralo y depresión. También se observa con frecuencia eritema, dolor y dureza en el sitio de la inyección. El tratamiento con interferón ocasiona inmunodepresión y puede dar lugar a algunas infecciones que se manifiestan de modos inusuales.

45 También se pueden dar corticoesteroides durante una recidiva para reducir la inflamación y acortar la crisis. El efecto potente de los corticoesteroides puede dar lugar a efectos secundarios graves que imitan la enfermedad de Cushing, un mal funcionamiento de las glándulas suprarrenales que da lugar a una sobreproducción de cortisol. La lista de los efectos secundarios posibles es larga, e incluye: incremento del apetito y aumento de peso; depósitos de grasa en tórax, rostro, región dorsal y estómago; retención de agua y de sales que conduce a tumefacción y edema; hipertensión arterial; diabetes; marcas negras y azules; enlentecimiento de la cicatrización de las heridas; osteoporosis; cataratas; acné; debilidad muscular; adelgazamiento de la piel; incremento de la propensión a infecciones; úlceras de estómago; incremento de la sudoración; cambios de humor; problemas psicológicos tales como la depresión; y supresión suprarrenal.

50

En 2004, la FDA autorizó el uso de un anticuerpo monoclonal (el natalizumab, Tysabri®, Biogen Idec Inc., Cambridge, Massachusetts, EE. UU., y Elan Pharmaceuticals, Inc., Dublín, Irlanda) para el tratamiento de los pacientes con formas recidivantes de la EM (*FDA News P04-107*, 23 de noviembre de 2004).

5 Aunque en general se tolera bien, en natalizumab de vez en cuando está asociado a reacciones adversas graves. El tratamiento con el anticuerpo es en general costoso y necesita que se mejore, entre otras, su eficacia.

En la actualidad se están investigando muchos otros anticuerpos monoclonales contra la EM, entre ellos algunos que ya se usan en otras afecciones. Estos incluyen el ocrelizumab (Genentech/Hoffmann-La Roche), el daclizumab (Biogen Idec, Inc.), el alemtuzumab (Campath®, MabCampath®, Bayer Schering, BTG, Genzyme, Millenium) y el rituximab (Rituxan®, MabThera®, Genentech, Hoffman-La Roche, Biogen Idec Inc.).

10 La solicitud de patente internacional WO 2006/065751 se refiere a un profármaco oligonucleotídico con CpG que incluye un sustituyente termoinestable en al menos un nucleótido del mismo. Se describen los métodos terapéuticos de uso de tales profármacos oligonucleotídicos con CpG termoinestables. Se describe la inducción de citocinas, en particular de los interferones, p. ej., el interferón α , el interferón β o el interferón γ .

15 La solicitud de patente internacional WO 2006/027776 se refiere a métodos para regular una vía biológica asociada a la AchE que tienen un componente de miRNA, en donde los métodos comprenden someter la vía biológica asociada a la AchE a un agente capaz de regular una función del miRNA, con lo que se regula la vía biológica asociada a la AchE. Dichos agentes incluyen secuencias polinucleotídicas modificadas.

20 La solicitud de patente internacional WO 2007/095316 se refiere de forma general a ácidos nucleicos inmunoestimulantes, composiciones de los mismos y métodos para utilizar los ácidos nucleicos inmunoestimulantes. En particular, la invención se refiere a ácidos nucleicos inmunoestimulantes que contienen palíndromos y al uso de estos ácidos nucleicos para tratar la enfermedad.

La solicitud de patente internacional WO 2004/016805 describe una clase de oligonucleotídicos inmunoestimulantes con CpG flexibles o semiflexibles que son útiles para estimular una respuesta inmunitaria.

25 Las solicitudes de patente internacional WO 2008/136748 A1, WO 2009/045145 A1 y WO 2009/154565 A1, todas ellas registradas por INDEX PHARMACEUTICALS AB, se refieren a oligonucleótidos inmunoestimulantes. Las solicitudes de patente internacional WO 2008/136748 y WO 2009/154565 presentan secuencias específicas de oligonucleótidos que contienen CpG que tienen un efecto profundo en diferentes formas de cáncer de humano cuando se administran por vía subcutánea y, en particular, cuando se administran a una membrana mucosa, p. ej., por vía intranasal, intravaginal o rectal. Se sugiere que los compuestos se usen en politerapia con un tratamiento contra el cáncer elegido entre radioterapia, tratamiento hormonal, intervención quirúrgica, quimioterapia, tratamientos inmunológicos, tratamiento fotodinámico, tratamiento con láser, hipertermia, crioterapia, inhibición de la angiogénesis, o una combinación de cualquiera de ellos, y, lo más preferiblemente, un tratamiento inmunológico que comprende la administración de un anticuerpo al paciente.

30

35 La solicitud de patente internacional WO 2009/045145 muestra que los compuestos oligonucleotídicos sustancialmente purificados y aislados pueden ser eficaces para reducir la tumefacción y el edema. Se presentan nuevos métodos y sustancias para la prevención, alivio o tratamiento del edema por diferentes causas.

Las solicitudes de patente internacional WO 2007/050034 A1, WO 2007/004977 A1 y WO 2007/004979 A1, también registradas por INDEX PHARMACEUTICALS AB, se refieren a las propiedades inmunomoduladoras que tienen oligonucleótidos y grupos de oligonucleótidos específicos.

40 La solicitud de patente internacional WO 2007/050034 se refiere a un método para reforzar la capacidad de respuesta clínica de un tratamiento antiinflamatorio en un paciente que padece una afección inflamatoria, que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-Xm-CG-Yn-3' y en donde X es A, T, C o G; Y es A, T, C o G; m = 1-40; n = 1-40, y en donde al menos un dinucleótido CG está sin metilar. La invención también abarca el uso de tal oligonucleótido para la fabricación de un medicamento para mejorar la eficacia de los corticoesteroides para el tratamiento de un paciente que padece una afección inflamatoria.

45

50 La solicitud de patente internacional WO 2007/004977 enseña métodos para mejorar la eficacia de los corticoesteroides en un paciente dependiente o resistente a los corticoesteroides que padece una afección inflamatoria que no responde, o que responde mal o inadecuadamente, al tratamiento antiinflamatorio, mediante la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-Xm-CG-Yn-3' y en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m = 1-100, n = 1-100, y en donde al menos un dinucleótido CG está sin metilar. La invención también abarca el uso de dicho oligonucleótido para la fabricación de sustancias farmacéuticas.

La solicitud de patente internacional WO 2007/004979 muestra que es posible mejorar la eficacia de los

corticoesteroides en un paciente resistente a los corticoesteroides que padece una afección inflamatoria que no responde, o que responde mal o inadecuadamente, al tratamiento antiinflamatorio, mediante la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-Xm-TTCGT-Yn-3' a 5, en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m = 0-7, n = 0-7, y en donde al menos un dinucleótido CG está sin metilar.

- 5 La solicitud de patente internacional WO 2008/147956 A2, de CENTOCOR INC, describe un oligonucleótido idéntico a la SEQ ID n.º 10 de la presente invención y sugiere que se use como modulador de la actividad de TLR3.

En resumen, es necesario mejorar los tratamientos actuales de la EM con el objetivo de mejorar su eficacia, así como reducir el coste y las reacciones adversas. También es necesario desarrollar nuevas estrategias de tratamiento para la batalla contra la EM.

10 Compendio

Los presentes inventores se dieron cuenta de que las estrategias actuales para tratar o aliviar la EM eran insuficientes a la vista de los resultados del tratamiento, así como del coste del tratamiento y la aparición de reacciones adversas. Los inventores se propusieron identificar nuevos compuestos útiles para el tratamiento y/o alivio de la EM, y para desarrollar métodos de tratamiento más eficaces y con menos reacciones adversas para los
15 pacientes. Otros problemas que subyacen en la invención, así como las ventajas asociadas a la invención, serán evidentes para el experto en la técnica tras el estudio de la descripción, de los ejemplos y de las reivindicaciones.

Los inventores encontraron sorprendentemente que las secuencias oligonucleotídicas específicas eran eficaces a la hora de inhibir o reducir la afluencia de las células autoagresivas al sistema nervioso central por la disminución de la expresión de determinados marcadores de la superficie celular. Las invenciones y realizaciones son tal y como se exponen en las reivindicaciones adjuntas.
20

Breve descripción de los dibujos

En la siguiente descripción detallada se hará referencia a los dibujos adjuntos en los que;

Las figuras 1-3 contienen diagramas de barras que muestran la expresión relativa normalizada de los ARNm de IFN- α (figura 1), IFN- β (figura 2) e IL-10 (figura 3) en los esplenocitos de rata estimulados con los compuestos de la invención y cultivados durante 24 horas. Los valores se normalizaron por el valor de RQ medio de las muestras que se estimularon sólo con el medio. Los datos se muestran como medias $\pm$ DE de esplenocitos procedentes de 6
25 bazos.

La figura 4 contiene un diagrama de barras que muestra la expresión de CD49d (IMF) en los esplenocitos de rata DA (n = 3). Los esplenocitos (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (10 μ M) con fármacos. Los compuestos de la invención eran capaces de disminuir el CD49d expresado en células que expresan CD3 después de 48 h de incubación, según se analizó mediante FACS.
30

En la figura 5 se muestra la expresión de CD49d (IMF) en las CMNSP de rata DA. Las CMNSP (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (10 μ M) con fármacos. Los compuestos de la invención eran capaces de disminuir el CD49d expresado en las células que expresan CD3 después de una incubación de 48 h, según se analizó mediante FACS.
35

La figura 6 contiene un gráfico que ilustra la puntuación clínica media de la EAE inducida con MOG en las ratas DA (hembras), en donde se muestra el efecto terapéutico de los oligonucleótidos y del vehículo (PBS). Se inmunizaron 12 ratas en cada grupo con MOG de rata en el adyuvante incompleto de Freund (AIF) el día 0. Se administraron IDX9052, IDX9054, IDX0980 y el vehículo antes del máximo de la primera crisis (día 9 y día 15) y durante el máximo de la primera crisis (día 20). Se administraron por vía s.c. 150 μ g de fármacos en un volumen total de 100 μ l.
40

La figura 7 contiene un gráfico que muestra la incidencia de la EAE inducida con MOG en las ratas DA. La intensidad de la enfermedad se redujo en las ratas tratadas con IDX0980 e IDX9054 en comparación con los grupos tratados con PBS e IDX9052.

En la figura 8 se ilustra la puntuación clínica media de la EAE inducida con MOG en las ratas DA, en donde se muestra el efecto terapéutico de los oligonucleótidos y del vehículo (PBS). Se inmunizaron 16 ratas en cada grupo con MOG de rata en adyuvante incompleto de Freund (AIF) el día 0. El IDX9054 y el vehículo se administraron antes del máximo de la primera crisis (día 9 y día 15), y durante el máximo de la primera crisis (día 20). Se administraron 150 μ g de fármacos en un volumen total de 100 μ l por vía s.c. y 40 μ l por vía i.n.. El grupo de tratados con PBS sólo se trató por vía i.n.
45

En la figura 9 se muestra la mortalidad de la EAE inducida con MOG en las ratas DA. La mortalidad se redujo en los grupos tratados con IDX0980 e IDX9054 en comparación con el grupo tratado con PBS o con IDX9052. Las ratas se murieron de enfermedad o bien se sacrificaron de acuerdo con las normativas éticas. Los datos se presentan tanto a
50

día 25 como a día 35.

En la figura 10 se muestra la expresión de CD49d en las células que expresan CD3 aisladas de los pacientes con EMRR (n = 9). Las CMNSP (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (1, 10 y 25 μ M) con los fármacos. Los oligonucleótidos eran capaces de hacer disminuir la expresión de CD49d en los linfocitos T que expresan CD3 después de una incubación de 48 h según se analizó mediante FACS. Las barras de error indican el EEM, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, según se analizó mediante la prueba T no paramétrica, prueba por parejas relacionadas de Wilcoxon.

En la figura 11 se muestra la expresión de CXCR3 (CD183) en las células que expresan CD3 aisladas de los pacientes con EMRR. Las CMNSP (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (1, 10 y 25 μ M) con fármacos. El compuesto de la invención era capaz de hacer disminuir la expresión de CXCR3 en los linfocitos T que expresan CD3 después de una incubación de 48 h, según se analizó mediante FACS.

En la figura 12 se muestra la expresión de CXCR3 (CD183) en las células que expresan CD19 aisladas de los pacientes con EMRR. Las CMNSP (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (1, 10 y 25 μ M) con fármacos. Los oligonucleótidos eran capaces de hacer disminuir la expresión de CXCR3 en las células que expresan CD19 después de una incubación de 48 h, según se analizó mediante FACS.

En la figura 13 se muestra la expresión de CXCR3 (CD183) en las células que expresan CD14 aisladas de los pacientes con EMRR. Las CMNSP (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (1, 10 y 25 μ M) con los fármacos. Los oligonucleótidos eran capaces de hacer disminuir la expresión de CXCR3 en las células que expresan CD14 después de una incubación de 48 h, según se analizó mediante FACS.

En la figura 14 se muestra la expresión de CCR5 (CD195) en las células que expresan CD14 aisladas de los pacientes con EMRR. Las CMNSP (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (1, 10 y 25 μ M) con los fármacos. Los oligonucleótidos eran capaces de hacer disminuir la expresión de CCR5 en las células que expresan CD14 después de una incubación de 48 h, según se analizó mediante FACS.

En la figura 15 se muestra la expresión de CCR2 (CD192) en las células que expresan CD14 aisladas de los pacientes con EMRR en IMF (A) o % (B), respectivamente. Las CMNSP (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (1, 10 y 25 μ M) con fármacos. Los oligonucleótidos eran capaces de hacer disminuir la expresión de CCR2 en las células que expresan CD14 después de una incubación de 48 h, según se analizó mediante FACS.

En la figura 16 se muestra la migración de las células hacia MCP-1 y RANTES. Las CMNSP $0,5 \times 10^6$ (A) o $0,250 \times 10^6$ (B) de dos pacientes con EMRR se incubaron con los compuestos de la invención IDX9045, IDX9054, IDX0980 (1, 10 y 25 μ M) o se dejaron sin tratar durante 48 h. A continuación se utilizaron las células en un ensayo de migración QCM™ para analizar la migración hacia MCP-1 y RANTES. Ambos experimentos mostraron que se reducía la migración de las células tratadas con los compuestos de la invención en comparación con las células sin tratar.

En la figura 17 se muestra la expresión del VEGF en el sobrenadante de los pacientes con EMRR (n = 6-11). Las CMNSP (2×10^6 /ml) se dejaron sin tratar o se estimularon (1, 10 y 25 μ M) con los fármacos. Los oligonucleótidos eran capaces de disminuir el VEGF en el sobrenadante de las células estimuladas después de incubación 48 h, según se analizó con una micromatriz de perlas para citometría. Las barras de error indican el EEM, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, según se analizó mediante la prueba T no paramétrica, prueba por parejas relacionadas de Wilcoxon.

En la figura 18 se muestra la inducción del IFN- β en las CMNSP aisladas de pacientes con EMRR. Las CMNSP (2×10^6 /ml) de diferentes pacientes con EMRR (n = 6) se estimularon con tres concentraciones diferentes (1, 10 y 25 μ M) de oligonucleótidos. La producción del IFN- β se analizó después de incubaciones de 48 h con el kit de ELISA para el IFN- β .

Descripción

La siguiente descripción es el mejor modo que se contempla actualmente para realizar la invención. Esta descripción no se debe tomar en un sentido limitante, sino que se hace únicamente con el propósito de describir los principios generales de la invención. El alcance de la invención se debe determinar con respecto a las reivindicaciones.

Antes de describir la invención con detalle, se debe saber que esta invención no se limita a los compuestos concretos descritos ni a las etapas de proceso de los métodos descritos, ya que tales compuestos y métodos pueden variar. También se debe saber que la terminología utilizada en la presente memoria solo cumple el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante. Se debe señalar que, tal y como se usa en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una», «la» y «el» incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Así pues, por ejemplo, la referencia a «una secuencia» incluye más de una de tal secuencia, y similares.

Además, el término «aproximadamente» se utiliza para indicar una desviación de $\pm 2\%$ del valor dado, preferiblemente $\pm 5\%$ y lo más preferiblemente $\pm 10\%$ de los valores numéricos, cuando sea aplicable.

- 5 El término «afluencia», tal y como se utiliza en la expresión «la afluencia de células autoagresivas al sistema nervioso central», pretende significar la acumulación de células autoagresivas en el sistema nervioso central e incluye las etapas de migración, adhesión y transmigración de las células mononucleares, en particular linfocitos T, linfocitos B y monocitos.

Se describen nucleótidos específicos, a saber, las secuencias oligonucleotídicas aisladas de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID n.^{os} 1 a 8. Véase la tabla 1, que correlaciona los números de SEQ ID, las referencias internas y las secuencias.

10 Tabla 1. Oligonucleótidos

SEQ ID n.º	Seq 5'-3'	IDX-n.º
1	G*G*G*TCGCAGC*T*G*G	IDX9045
2	G*G*G*GTCGTCTGC*G*G*G	IDX9054
3	T*C*G*TCGTTCCGCCGATCG*T*C*C	IDX9038
4	G*G*G*GTCGCAGCT*G*G*G	IDX9004
5	G*G*G*GTCGTCTG*C*G*G	IDX9052
6	T*C*G*TCGTTCTGCCATCGTC*G*T*T	IDX9022
7	G*A*T*CGTCCGTCGG*G*G*G	IDX9058
8	G*G*G*GATCGTCCG*G*G*G	IDX9060
9	G*G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G*C	IDX0150
10	G*G*GGGACGATCGTCG*G*G*G*G*G	IDX0980

*= Modificación con fosforotioato

La SEQ ID n.º 10, aunque se sabe que se usa en la medicina (véase a continuación), según lo que saben los inventores no se conoce que previamente se haya usado para el tratamiento de la EM.

- 15 La SEQ ID n.º 9 (IDX0150) se conoce a partir de la patente de los EE. UU. US 6.498.147 y se ha analizado con éxito en los ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de enteropatías inflamatorias (Kappaproct®, Index Pharmaceutical AB, Solna, Suecia). La SEQ ID n.º 10 (IDX0980) se utilizó originalmente y se sabe que es un potente oligonucleótido inmunomodulador en los humanos (Kerkmann et al., 2005; Wikström et al., 2007).

- 20 Los presentes inventores dan a conocer un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado elegido entre las SEQ ID n.^{os} 1 a 8.

De acuerdo con una realización, al menos un nucleótido en tales oligonucleótidos tiene una modificación del esqueleto de fosfatos. Preferiblemente, dicha modificación del esqueleto de fosfatos es una modificación con fosforotioato o fosforoditioato.

- 25 Los inventores también dan a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID n.^{os} 1 a 8. Dichas composiciones farmacéuticas además comprenden preferiblemente un excipiente o vehículo farmacológicamente compatible y fisiológicamente aceptable, elegido entre solución salina, liposomas, tensioactivos, compuestos mucoadherentes, inhibidores de enzimas, sales biliares, potenciadores de la absorción, ciclodextrinas, o una combinación de los mismos.

- 30 Otra realización de la invención es el uso de un oligonucleótido sustancialmente purificado y aislado de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID n.^{os} 1 a 8 para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o alivio de la esclerosis múltiple.

Otra realización es el uso de un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado de acuerdo con la SEQ ID n.º 9 [IDX0150] o la SEQ ID n.º 10 [IDX0980] para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o alivio de la esclerosis múltiple, en concreto esclerosis múltiple en recidiva-remisión.

- 5 Sin desear comprometerse con ninguna teoría específica, los inventores contemplan que el efecto de los compuestos de la invención es al menos en parte explicable por su capacidad para inhibir o reducir la afluencia de las células autoagresivas al sistema nervioso central por la disminución de la expresión de al menos un marcador de la superficie celular. En consecuencia, una realización de la invención implica la administración de un oligonucleótido de acuerdo con las SEQ ID n.^{os} 1 a 8 o 9 a 10 en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la afluencia de las células autoagresivas al sistema nervioso central por la disminución de la expresión de al menos un marcador de la superficie celular.
- 10 Se contempla que los oligonucleótidos y los métodos para su uso sean también aplicables por lo general al tratamiento o al alivio de una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, en donde dicho oligonucleótido se administra en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la afluencia de las células mononucleares al sistema nervioso central por la disminución de la expresión de al menos un marcador de la superficie celular.
- 15 Preferiblemente, dicho al menos un marcador de la superficie celular se elige entre CD49d, CXCR3 (CD183), CCR2 (CD192) y CCR5 (CD195). De acuerdo con una realización, dicho oligonucleótido se elige entre SEQ ID n.^o 1 [IDX9045], SEQ ID n.^o 2 [IDX9054], SEQ ID n.^o 7 [IDX9058], SEQ ID n.^o 3 [IDX9038]. Preferiblemente, dicho oligonucleótido es la SEQ ID n.^o 1 [IDX9045]. De acuerdo con otra realización, dicho al menos un marcador de la superficie celular es CD49d y el oligonucleótido se elige entre SEQ ID n.^o 3 [IDX9038] o SEQ ID n.^o 7 [IDX9058].
- Sin embargo, los inventores también contemplan, de nuevo sin desear comprometerse con ninguna teoría específica, que el efecto es al menos explicable por la inhibición o reducción de la afluencia de las células autoagresivas al sistema nervioso central por la reducción de la producción del VEGF.
- 20 Por consiguiente, de acuerdo con otra realización de la invención, el oligonucleótido se elige entre SEQ ID n.^o 1 [IDX9045] y SEQ ID n.^o 10 [IDX0980].
- La invención también da a conocer un método para el tratamiento y/o el alivio de la esclerosis múltiple, en donde un oligonucleótido se administra en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la afluencia de las células autoagresivas al sistema nervioso central por la disminución de la expresión de determinados marcadores de la superficie celular.
- 25 Preferiblemente, se administra a un paciente una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID n.^{os} 1 a 8, 9 y 10.
- Preferiblemente, la vía de administración se elige entre administración por vía mucosa, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Preferiblemente, la administración por vía mucosa se elige entre administración por vía nasal, oral, gástrica, ocular, rectal, urogenital y vaginal.
- 30 En el método anterior, el marcador de la superficie celular es al menos uno de CD49d, CXCR3 (CD183), CCR2 (CD192) y CCR5 (CD195), y el oligonucleótido se elige entre SEQ ID n.^o 1 [IDX9045], SEQ ID n.^o 2 [IDX9054], SEQ ID n.^o 7 [IDX9058] y SEQ ID n.^o 3 [IDX9038].
- De acuerdo con una realización preferida, el marcador de la superficie celular es CD49d y el oligonucleótido se elige entre SEQ ID n.^o 3 [IDX9038] o SEQ ID n.^o 7 [IDX9058].
- 35 De acuerdo con otra realización de un método para el tratamiento y/o el alivio de la esclerosis múltiple, dicho oligonucleótido se administra en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la afluencia de las células autoagresivas al sistema nervioso central por la reducción de la producción del VEGF. En esta realización, el oligonucleótido se elige preferiblemente entre SEQ ID n.^o 1 [IDX9045] y SEQ ID n.^o 10 [IDX0980].
- 40 De acuerdo con una realización, el oligonucleótido se administra en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 µg/kg de masa corporal, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 µg/kg de masa corporal. Lo más preferiblemente, el oligonucleótido se administra en una cantidad de aproximadamente 1 a 500 µg/kg de masa corporal.
- 45 En un método de acuerdo con la invención, la vía de administración se elige entre administración por vía mucosa, subcutánea, intramuscular, intravenosa e intraperitoneal. De acuerdo con una realización del método, la administración por vía mucosa se elige entre administración por vía nasal, oral, gástrica, ocular, rectal, urogenital y vaginal.
- 50 La administración nasal constituye una realización del método de acuerdo con la invención. Hay varios métodos y dispositivos disponibles para la administración nasal; dosificación única o múltiple de formulaciones líquidas y en polvo, con acción tópica o bien sistémica. Con el uso de los dispositivos o de las técnicas de administración adecuadas, es posible actuar selectivamente sobre la región del bulbo olfativo para la administración al SNC. La presente invención no se limita a métodos o dispositivos concretos para administrar los oligonucleótidos a la membrana mucosa nasal. Los estudios iniciales con animales han demostrado que la instilación simple con pipeta funciona satisfactoriamente, aunque para el uso en los humanos se preferirán los dispositivos fiables para la

administración de dosis únicas o múltiples.

De acuerdo con otra realización de la invención, los oligonucleótidos se administran en la membrana mucosa del colon a través de la instilación rectal, p. ej., en forma de un enema acuoso que comprende los oligonucleótidos suspendidos en un tampón adecuado.

- 5 De acuerdo con otra realización de la invención, los oligonucleótidos se administran en la membrana mucosa de los pulmones o de las vías respiratorias a través de la inhalación de un aerosol, que comprende los oligonucleótidos suspendidos en un tampón adecuado o mediante un lavado, que también comprende los oligonucleótidos suspendidos en un tampón adecuado.

- 10 De acuerdo con otra realización más de la invención, los oligonucleótidos se administran en la membrana mucosa del aparato genitourinario, tal como la uretra, la vagina, etc., mediante la aplicación de una solución, un tampón, un gel, pomada balsámica, pasta o similar, que comprende los oligonucleótidos suspendidos en un vehículo adecuado.

- 15 Una realización particular implica el uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención para ser usado junto con la administración de Tysabri, un anticuerpo dirigido contra el CD49d, un marcador de la superficie celular de los linfocitos T. Hay indicaciones de que los oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden disminuir el CD49d, lo que podría reducir la trans migración de los linfocitos T a través de la barrera hematoencefálica. Así pues, los inventores dan a conocer una politerapia que implica el uso de compuestos oligonucleotídicos junto con un anticuerpo anti-CD49d. Se contempla que sea capaz de reducir el consumo de anticuerpos y, con ello, reducir el coste, los efectos secundarios y los riesgos asociados al tratamiento con dicho anticuerpo. En consecuencia, en esta realización, dicho compuesto se administra suficientemente antes de la administración de un anticuerpo para permitir la disminución de determinadas moléculas de la superficie celular contra las cuales está dirigido el anticuerpo.

- 20 Un experto en la técnica es bien consciente del hecho de que hay varias estrategias para el tratamiento de la EM. Se están desarrollando constantemente estrategias naturalmente nuevas y se concibe que los oligonucleótidos, su uso y los métodos de tratamiento de acuerdo con la presente invención encontrarán utilidad también en combinación con tratamientos futuros. Los inventores creen actualmente que los oligonucleótidos de la invención, su uso y los métodos de tratamiento serán útiles como un tratamiento autónomo contra la EM. Sin embargo, no se puede descartar que los oligonucleótidos de la invención tengan utilidad en combinación con los tratamientos anti-EM actuales o futuros.

- 25 El oligonucleótido se administra en una dosis terapéuticamente eficaz. La definición de una «dosis terapéuticamente eficaz» depende de la enfermedad y del ajuste del tratamiento, en donde una «dosis terapéuticamente eficaz» es una dosis que bien sola o en combinación con otros tratamientos da lugar a una mejora medible de la afección del paciente. Un experto en la técnica puede determinar una dosis terapéuticamente eficaz de forma empírica o bien basándose en los experimentos de laboratorio, realizados sin una carga indebida. El médico de cabecera también puede determinar una dosis adecuada, basándose en su experiencia y considerando la naturaleza y la intensidad de la enfermedad, así como de la afección del paciente.

- 30 Otra realización es la administración del oligonucleótido en dos o tres o más dosis independientes, separadas en el tiempo por aproximadamente 12, aproximadamente 24 horas.

La invención encuentra utilidad en el tratamiento de la EM, según confirman los datos *in vivo* e *in vitro* presentados en el apartado experimental, y según se ilustra en las figuras adjuntas.

- 35 Las realizaciones de la invención tienen muchas ventajas. Hasta ahora, la administración de un oligonucleótido en las dosis definidas por los inventores no ha desencadenado ningún efecto secundario destacado. Además, la administración por vía mucosa es fácil, rápida e indolora, y da lugar sorprendentemente a un efecto sistémico. Se mantiene que este efecto, por sí solo o bien en combinación con los tratamientos anti-EM actuales y futuros, ofrece una estrategia prometedora para luchar contra esta enfermedad, así como contra las enfermedades relacionadas.

Ejemplos

- 45 Ejemplo 1: El efecto de los oligonucleótidos sobre los esplenocitos de rata

- Los presentes inventores se propusieron encontrar y validar los compuestos candidato que serían beneficiosos para el tratamiento y/o el alivio de la EM. Los compuestos utilizados en estos estudios se basan en oligodesoxinucleótidos. Antes de que se pudiera analizar el efecto beneficioso de los oligonucleótidos específicos en estudios *in vitro* e *in vivo*, se desarrolló un ensayo que permitió a los inventores analizar si un oligonucleótido tiene un efecto inmunomodulador en las ratas. Para este propósito, los inventores utilizaron un ensayo con esplenocitos de rata, en donde los esplenocitos se incubaron durante un tiempo determinado con una selección de compuestos de la invención. Después de la incubación, se analizó la expresión del ARNm de varios marcadores inmunológicamente relevantes (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-10, TNF- α , VEGF-A, CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-10 y TGF- β 1), los que sirvió de base para identificar los compuestos que muestran efectos

inmunomoduladores en las ratas y permitieron la selección de los compuestos a utilizar en otros estudios con ratas.

Materiales y métodos

Oligodesoxinucleótidos: en el presente estudio se utilizaron 6 oligonucleótidos diferentes para los experimentos de estimulación con esplenocitos procedentes de ratas. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en Biomers.net (Ulm, Alemania). Tras la llegada, todos los oligonucleótidos se diluyeron con agua estéril en una serie de diluciones diferentes. Se determinó la densidad óptica (DO) A_{260}/A_{280} en al menos cinco o más muestras de cada dilución con un espectrofotómetro (SmartSpect™ 3000, BioRad, Hercules, CA). La concentración media de todas las lecturas, para todas las diluciones, se calculó para determinar la concentración de la solución concentrada. Estas soluciones concentradas se almacenaron a -20°C . Las diferentes soluciones de trabajo utilizadas en los experimentos, 1 μM y 10 μM , se prepararon mediante la dilución adicional en agua destilada (Invitrogen, Carlsbad, CA) de las soluciones oligonucleotídicas concentradas. Se disminuyó al mínimo la repetición de ciclos de congelación/descongelación para limitar cualquier degradación de los compuestos.

Cebadores para PCR: Se diseñaron cebadores específicos de gen con el uso del programa informático Primer Express de Applied Biosystems (tabla 2; Foster City, CA). La amplificación/detección del ADN genómico contaminante se evitó al construir uno de los cebadores sobre una frontera entre exón e intrón. Se encargaron los oligonucleótidos cebadores a MWG Biotech (Ebersberg, Alemania).

Preparación de los esplenocitos de rata: Se utilizaron en el estudio 6 bazos procedentes de ratas DA hembra. Los bazos no se combinaron, sino que se trataron por separado para valorar el grado de la variabilidad. Las suspensiones celulares se prepararon en condiciones estériles con un colador celular de nilón de 70 μm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). A continuación, las células se lavaron dos veces en RPMI 1640 completo (RPMI 1640 con SBF al 5% inactivado por calor (Invitrogen), L-glutamina a 2 mM (Sigma-Aldrich), penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Invitrogen) a 1200 rpm durante 7-10 minutos a 4°C . Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante dos minutos más a temperatura ambiente. Se añadieron otros 5 ml de medio completo antes de la centrifugación, lo que se realizó como se describió previamente. Después de decantar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en el medio completo y se contaron las células con exclusión de azul tripano al 0,4% (Sigma-Aldrich) en un microscopio Eclipse TE2000-S de Nikon (Nikon, Tokio, Japón).

Estimulación *in vitro*: Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos con fondo en V en medio RPMI 1640 completo a una concentración de 10×10^6 células/ml, lo que corresponde a 5×10^5 células por pocillo. Directamente después de sembrar las células, se les añadió un oligonucleótido diluido en el medio RPMI 1640 de manera que la concentración final del oligonucleótido añadido alcanzara 1 μM y 10 μM , respectivamente. Las incubaciones se realizaron por duplicado. Las células se incubaron en un incubador de cultivo celular humidificado (Thermo Scientific, Waltham, MA) con CO_2 al 5% en el aire a 37°C durante 24 horas. Después del periodo de incubación, las suspensiones celulares se combinaron y se añadieron a 1 ml de PBS enfriado en hielo, y después se lavaron a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C . Finalmente se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se disolvió posteriormente, y se lisó en 350 μl de tampón RLT con adición de β -mercaptoetanol al 1%. Las suspensiones celulares lisadas se congelaron a -20°C hasta el posterior procesamiento.

RT-PCR: Se extrajo el ARN total (kit de extracción de ARN total de Qiagen, Qiagen, Hilden, Alemania). Se incubaron las muestras con 27 kU de ADNasa durante 30 minutos a 37°C para impedir la amplificación/detección del ADN genómico contaminante. Después de que el ARN se eluyese en 40 μl de agua sin ARNasas, se tomaron 5 μl del eluido de ARN para determinar la concentración del ARN mediante espectrofotometría. Se realizó la transcripción inversa con 0,15-1 μg de ARN total, hexámeros aleatorios (0,1 μg ; Invitrogen) y la transcriptasa inversa Superscript (200 U; Invitrogen) siguiendo las directrices de los fabricantes. El ADNc resultante se diluyó con agua desionizada estéril para formar soluciones concentradas de ADNc. La amplificación se realizó con el sistema de PCR en tiempo real 7500 de Applied Biosystems con SYBR-Green I (Applied Biosystems) con un protocolo de PCR de dos etapas (95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto). En los experimentos preliminares se analizaron las parejas de cebadores con un protocolo de PCR convencional. Los productos de la PCR se migraron en un gel de agarosa y en todos los casos estaban confinados en una sola banda del tamaño esperado. Todos los cebadores utilizados se recogen en la tabla 2.

La valoración semicuantitativa de la cantidad de ARNm se realizó con el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ con amplificación del ARNm y la actina- γ , un gen de mantenimiento, en tubos diferentes. Todas las muestras se hicieron por duplicado. Se calcularon los datos de la PCR en tiempo real (valores de ΔCt y de RQ individuales) y se analizaron con el programa informático System SDS para PCR en tiempo real 7500. A continuación, cada uno de los valores se exportó a Excel. Para cada uno de los genes, los valores RQ promedio de las muestras por duplicado se normalizaron por el valor de RQ promedio de las muestras que se estimularon sólo con el medio. Se calcularon de esta forma los valores medios y la desviación estándar de las seis poblaciones independientes de esplenocitos.

Tabla 2. Secuencias de cebadores para la PCR en tiempo real

Gen		Secuencia oligonucleotídica
IFN- α	☐ Directo	5'-CCTCTTCACATCAAAGGAGTCATCT
	Inverso	5'-ACAGGCTTGCAGACCACTCA
IFN- β	☐ Directo	5'-GCGTTCCTGCTGTGCTTCTC
	Inverso	5'-TGCTAGTGCTTTGTCGGAAGT
IFN- γ	☐ Directo	5'-TCGCCAAGTTCGAGGTGAA
	Inverso	5'-TAGATTCTGGTGACAGCTGGTGAA
IL-6	Directo	5'-CACCCACAACAGACCAGTATATACCA
	Inverso	5'-TGCCATTGCACAACCTTTTCT
IL-10	Directo	5'-TGCGACGCTGTCATCGAT
	Inverso	5'-GACACCTTTGTCTTGGAGCTTATTAA
TNF- α	☐ Directo	5'-TGATCGGTCCCAACAAGGA
	Inverso	5'-TGCTTGGTGGTTTGCTACGA
CXCL-1	Directo	5'-TCACTTCAAGAACATCCAGAGTTTG
	Inverso	5'-GTGGCTATGACTTCGGTTTGG
CXCL-2	Directo	5'-AAGATACTGAACAAAGGCAAGGCTAA
	Inverso	5'-TTGATTCTGCCCCGTTGAGGTA
CXCL-10	Directo	5'-CATGTTGAGATCATTGCCACAA
	Inverso	3'-CCGCTTTCAATAAGCTCTTGATG
CCL-2	Directo	5'-CCAATGAGTCGGCTGGAGAA
	Inverso	3'-GAGCTTGGTGACAAATACTACAGCTT
CCL-3	Directo	5'-AGCCGGGTGTCATTTTCCT
	Inverso	3'-TTGGACCCAGGTCTCTTTGG
CCL-4	Directo	5'-GCACCAATAGGCTCTGACCCT
	Inverso	3'-TTGGTCAGAAATACCACAGCTGG
CCL-5	Directo	5'-CCTTGCAAGTCGTCTTTGCACT
	Inverso	3'-GATGTATTCTTGAACCACTTCTTCTC
VEGF-A	Directo	5'-GGGCTGCTGCAATGATGAA
	Inverso	3'-TTGATCCGCATGATCTGCAT
TGF- β 1	Directo	5'-ACGTGGAAATCAATGGGATCA
	Inverso	3'-GGAAGGGTCGGTTCATGTCA
	Inverso	5'-CCGACGATGGAAGGAAACAC

Resultados

Inicialmente, el foco del estudio estaba en las citocinas IFN- α , IFN- β e IL-10 debido a que se había sugerido que tenían efectos protectores para la EM y, por lo tanto, sólo se incluyen los gráficos para estos factores.

- 5 El ARNm tanto del IFN- α (figura 1) como del IFN- β (figura 2) se indujo con varios oligonucleótidos y, en especial, IDX9052, IDX 9054, IDX9060 e IDX9080 indujeron una gran cantidad de ARNm para estos genes. Los oligonucleótidos que no eran capaces de inducir el IFN- α/β incluyen el IDX9022 y el IDX9045.

- 10 A diferencia de los interferones de tipo I, la IL-10, una potente citocina relacionada con Th-2, se indujo en mucho menos cantidad. El IDX9060 y el IDX9080 están entre los oligonucleótidos que inducen la cantidad más alta de IL-10, tal y como se muestra en la figura 3. Los valores estaban normalizados al valor de RQ medio de las muestras que se

estimularon solo con el medio. Los datos se muestran como medias $\pm$ DE de esplenocitos procedentes de 6 bazos.

El patrón del IFN- γ , del CXCL-10 y del VEGF-A eran casi idénticos al patrón de los interferones de tipo I y varios oligonucleótidos los inducían de manera moderada a fuerte (datos sin mostrar). La mayoría de los oligonucleótidos indujo solo una escasa cantidad del ARNm de IL-6 y la diferencia entre los compuestos probados era relativamente pequeña (datos sin mostrar).

El ARNm del TNF- α y del TGF- β apenas se veían afectados por ninguno de los oligonucleótidos analizados, ya que ninguna de estas moléculas pudo cambiar su expresión de manera significativa. Sin embargo, es interesante señalar que se observó que IDX9022 e IDX9045 produjeron una disminución notable del TGF- β (datos sin mostrar).

Si se intenta resumir los datos sobre las restantes quimiocinas, entonces se ve con claridad que hay dos grupos: un grupo que consiste en los genes que responden al tratamiento con un oligonucleótido y otro grupo que consiste en los genes que no responden o que incluso disminuyen después del cultivo con un oligonucleótido. Al primer grupo pertenecen MIP-1 α , MCP1 y CCL-5, mientras que al segundo grupo pertenecen CCL-4, MIP-2 y CINC. En ninguno de los grupos se pudo observar un solapamiento claro entre los genes.

En conclusión, se ha hecho evidente que los fármacos candidato de los inventores son capaces de estimular las células de rata y, con ello, cambiar el nivel de expresión de varios genes marcadores inmunológicamente relevantes. Estos resultados proporcionaron la base para centrarse en oligonucleótidos específicos en otros estudios, entre ellos en un modelo de EAE de rata.

Ejemplo 2: Reducción de la expresión de CD49d en las células de rata *in vitro*

Los inventores se propusieron investigar si los compuestos de la invención pueden reducir la CD49d (una molécula importante de la superficie de los linfocitos que interacciona con los receptores que hay sobre las células endoteliales) y, con ello, reducir la trans migración de las células al SNC, a saber, una etapa crítica para la patogenia de la EM. Los inventores utilizaron esplenocitos o sangre de rata para estudiar la expresión de CD49d tras la estimulación con los compuestos de la invención.

Material y métodos

Los esplenocitos (n = 3) o las CMNSP (n = 1) de ratas DA se incubaron a 37 °C en un volumen de 500 μ l de medio RPMI completo (con SBF al 10%, PenStrep al 1%, L-glutamina a 2 mM, HEPES a 10 mM y piruvato de sodio a 1 mM) en placas de 48 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml y se trataron con 10 μ M de IDX9022, IDX9058, IDX9038, IDX0150, IDX9054 e IDX9045.

Al cabo de 48 horas se sedimentaron por centrifugación en placas de 96 pocillos 200 μ l de la suspensión celular, se resuspendieron en 100 μ l de SBF al 2% (en PBS) y se incubaron con los anticuerpos anti-CD49d y anti-CD3 conjugados con fluorocromos (Becton Dickinson, San Jose, California) durante 30 min a 4 °C. A continuación se lavaron las células dos veces en PBS puro y posteriormente se analizaron por FACS con un bioanalizador FACSArray (BD) para el análisis de la expresión del antígeno de superficie.

Resultados

Los esplenocitos de 3 ratas DA agrupadas mostraron una disminución de CD49d tras el tratamiento con los compuestos de la invención (figura 4). La disminución más pronunciada se observó con IDX0150, IDX9045 e IDX9054 48 h después de la incubación. En las CMNSP de 1 rata DA disminuyó la CD49d tras el tratamiento con los compuestos de la invención (figura 5). Esta disminución era más pronunciada con IDX0150 e IDX9038 48 h después de la incubación.

En los esplenocitos y en las CMNSP tratados con los compuestos de la invención se observó una disminución de la expresión de CD49d. Estas propiedades de los compuestos de la invención pudieron reducir el proceso de la trans migración y, mediante esto, la afluencia de células al SNC, bien como un tratamiento autónomo o bien como una politerapia con el tratamiento con anticuerpos.

Ejemplo 3: estudios con animales

Los inventores ordenaron estudios con animales para confirmar su hipótesis y para analizar diferentes compuestos candidato. Se realizaron dos estudios con la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) inducida con MOG en las ratas DA.

La EAE inducida con MOG en las ratas DA es un modelo experimental bien caracterizado con una alta reproducibilidad que comparte muchas características con la esclerosis múltiple de su homólogo humano y, como tal, es un modelo adecuado para las pruebas terapéuticas (Gold et al., 2006, Friesse et al., 2006). Después de la inmunización con MOG en AIF, los animales sufrieron una parálisis progresiva desde la cola, a través de las patas

traseras, hasta las patas delanteras debido a la degeneración progresiva de la mielina ocasionada por la infiltración de células inmunitarias inflamatorias en la médula espinal y en el cerebro. La patogenia es una recaída crónica, con recuperación parcial de los animales y a continuación una recaída con la enfermedad intensificada, y es resultado de la actividad tanto de los monocitos como de los linfocitos T (citocinas de tipo 1) y de los linfocitos B (anticuerpo).

- 5 La rata se eligió como una especie roedora ya que es un modelo experimental de recaídas/remisiones ampliamente aceptado. Se ha descrito que la cepa seleccionada es susceptible a la inflamación del SNC. En general, del 50% al 80% de las ratas inmunizadas desarrollan una enfermedad recidivante después de una inmunización titulada. Las restantes desarrollan una enfermedad crónica tardía o bien mueren durante la primera crisis.

- 10 Animales de ensayo: Se utilizaron ratas DA (hembras, de 180 a 250 g, de 10 a 14 semanas de edad) de B & K, Sollentuna, Suecia. Se dejó que los animales se aclimatasen durante al menos 7 días antes de comenzar el análisis. En este tiempo, se observó a los animales a diario para determinar su idoneidad para el estudio. Los animales que mostraban signos de enfermedad, alguna anomalía, o que estaban en los extremos de intervalo de masa corporal, fueron reemplazados antes del estudio.

- 15 Los grupos se distribuyeron dentro y entre barreras de una manera que permitió que las influencias medioambientales a lo largo del estudio resultaran equivalentes. Los animales de prueba se identificaron mediante una etiqueta en la oreja. La tarjeta de la jaula indicaba el número del experimento y solo el código del grupo.

- 20 Alojamiento: Se alojaron cuatro animales por jaula, a menos que quedara reducido por mortalidad o aislamiento. Las jaulas eran jaulas de plástico makrolon convencionales con tapas de acero inoxidable. Se utilizaron virutas Aspen para revestir el suelo. Se suministró aire filtrado, sin recirculación. La temperatura se mantuvo dentro del intervalo de 20 a 23 °C y a humedad relativa dentro del intervalo del 40 al 60%. La temperatura y la humedad relativa se vigilaron cada día. Las condiciones de luz fueron de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (07:00-19:00).

- 25 Dieta. A los animales del análisis se les dio una dieta de roedores convencional (R 36 (irradiada) de Lactamin, Suecia) a voluntad. Antes de la administración, el proveedor analizó cada lote de dieta en busca de varios componentes nutricionales y contaminantes químicos y microbiológicos. Los certificados analíticos de los proveedores se escrutaron y aprobaron antes de liberar para algún lote de dieta para ser usado.

Esta dieta no contenía ningún antibiótico ni ningún otro agente quimioterápico ni profiláctico. A los animales del análisis se les dio, mediante tubos sorbedores, agua a voluntad (agua corriente del grifo) que circula por tuberías de polietileno o policarbonato.

- 30 Procedimiento de inmunización: se inmunizó a las ratas (día = 0) inyectándoles por vía i.d. en la base de la cola 0,1 ml de una emulsión compuesta por 30 µg de MOG de rata a pH 3 (solución concentrada de 5,2 mg/ml) en adyuvante incompleto de Freund (Sigma, St. Louis, EE. UU.). Este procedimiento se sabe que da lugar, comenzando aproximadamente en el día 10, a la aparición de la parálisis progresiva, que surge desde la cola y asciende progresivamente hasta las patas delanteras.

- 35 Duración del tratamiento: los compuestos problema y el control se administraron dos veces antes (a saber, día 11 y día 15) del máximo de la primera crisis, y el tercer tratamiento el día 20 (durante el máximo de la primera crisis).

Sustancias problema: en el primer estudio se utilizaron dos oligonucleótidos patentados, el IDX9052 (SEQ ID n.º 5) y el IDX9054 (SEQ ID n.º 2) junto con un oligonucleótido público disponible, el IDX0980 (SEQ ID n.º 10). En el segundo estudio se utilizó un oligonucleótido patentado, el IDX9054 (SEQ ID n.º 2). La secuencia de las sustancias problema se ofrece en la tabla 1.

- 40 Los compuestos problema del primer estudio (IDX9052, IDX9054 e IDX0980) se administraron por vía s.c. en un volumen total de 100 µl en el cuello. Esta dosis se administró tres veces. El compuesto problema del segundo estudio (IDX9054) se administró por vía s.c. en un volumen total de 100 µl en el cuello, o por vía i.n. en un volumen total de 40 µl en la nariz. Los fármacos se administraron tres veces bien s.c. o i.n. En ambos estudios se utilizó PBS como vehículo y control (blanco). La dosis administrada fue de 150 µg por inmunización en todos los estudios.

- 45 Diseño del estudio: En el primer estudio se hicieron cuatro grupos de 12 animales cada uno. Todos los grupos se inmunizaron con MOG de rata en AIF, de acuerdo con el protocolo de inmunización. Todos los compuestos se inmunizaron tres veces.

Grupo 1: grupo de control: vehículo solo, PBS por vía s.c.

Grupo 2: dosificado con 150 µg de IDX9052 por vía s.c.

- 50 Grupo 3: dosificado con 150 µg de IDX9054 por vía s.c.

Grupo 4: dosificado con 150 µg de IDX0980 por vía s.c.

El número de animales por grupo era el número mínimo que permite una valoración exacta de los efectos farmacológicos observados.

En el segundo estudio se hicieron tres grupos de 16 animales cada uno. Todos los grupos se inmunizaron con MOG de rata en AIF, de acuerdo con el protocolo de inmunización. Todos los compuestos se inmunizaron tres veces.

5 Grupo 1: dosificado con 150 µg de IDX9054 por vía s.c.

Grupo 2: grupo de control: vehículo solo, PBS por vía i.n.

Grupo 3: dosificado con 150 µg de IDX9054 por vía i.n.

10 Observaciones clínicas: Los animales se inspeccionaron al simple vista al menos dos veces al día en busca de pruebas de reacción al tratamiento o de enfermedad. Se comenzó el día 5 y los animales se examinaron por separado para detectar la presencia de parálisis por medio de la puntuación clínica siguiente:

0 = ningún signo de enfermedad

1 = debilidad en la cola o parálisis de la cola

2 = paraparesia de las patas traseras o hemiparesia

3 = parálisis de las patas traseras o hemiparálisis

15 4 = parálisis completa (tetraplejía)

5 = estado moribundo o muerte

La ataxia se evaluó por sistema. Se definió una remisión de la enfermedad como una mejora de la puntuación de la enfermedad durante al menos 2 días consecutivos. Se definió una recaída como un incremento del déficit clínico de al menos 2 puntos que permaneció durante al menos 2 días.

20 Los resultados de las puntuaciones clínicas se expresaron como la puntuación media ($\pm$ EEM) dentro de cada grupo. Los efectos de las sustancias problema se compararon con la del grupo de control tratado con el vehículo. Las diferencias de los valores de la puntuación clínica entre los grupos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida, en caso de significación, por la prueba por parejas relacionadas de Wilcoxon, en cada momento de la medición.

25 Se observó a los animales en una habitación tranquila. Un técnico que desconocía los tratamientos vigiló los signos clínicos cada día en cada grupo de tratamiento con anonimato. También se vigiló cada día la masa corporal de los animales.

30 Los animales que se consideraba que sentían dolor, malestar o tenían una afección terminal fueron examinados por el personal veterinario o el personal autorizado y, si era necesario, se sacrificaron por compasión para disminuir al mínimo el dolor innecesario o el sufrimiento.

Resultados

35 Estado del animal: en el primer estudio, todos los animales toleraron el tratamiento s.c. con el vehículo o con IDX9052, IDX9054 e IDX0980 sin ningún efecto adverso ni físico ni de comportamiento, según se evaluó cada día. En el segundo estudio, todos los animales toleraron el tratamiento i.n. y s.c. con el vehículo o el IDX9054 sin ningún efecto adverso ni físico ni de conducta según se evaluó cada día, con la excepción de un animal del grupo de control i.n. con PBS que murió inmediatamente después de un tratamiento, un acontecimiento que no se considera natural. Un animal del mismo grupo desarrolló artrosis y fue sacrificado de acuerdo con las directrices éticas.

40 Al comienzo de la enfermedad se produjo la pérdida de peso que habitualmente va asociada, que continuó a partir de entonces en todos los estudios. Debido a la variabilidad de la incidencia de la enfermedad y a la mortalidad entre los grupos, el análisis estadístico de las diferencias entre los grupos no es informativa. Sin embargo, los grupos tratados con IDX9054 e IDX0980 perdieron menos peso que el grupo de control con PBS en el primer estudio y, en el segundo estudio, los grupos tratados con IDX9054 por vía i.n. y s.c. perdieron menos peso que el grupo de control con PBS por vía i.n.

45 Evolución de la enfermedad clínica: en el estudio número uno, todos los grupos de ratas se valoraron cada día para detectar signos clínicos de la enfermedad. Comenzaron a desarrollar la EAE desde el día 10 (figura 6). Cuatro animales del grupo tratado con IDX0980 y tres animales de los grupos tratados con IDX9054 nunca desarrollaron la enfermedad, pero sin embargo los otros grupos alcanzaron una incidencia de la enfermedad clínica del 100% hacia el día 16 (figura 7). Había una diferencia significativa entre la incidencia en el grupo tratado con IDX0980 y el grupo

de control ($p = 0,0285$). Todos los animales se incluyeron en el análisis presentado. En el segundo estudio, las ratas comenzaron a desarrollar la EAE desde el día 11 (figura 8). Cinco animales de los grupos tratados con IDX9054 por vía s.c. e i.n. nunca desarrollaron la enfermedad, pero el grupo con PBS por vía i.n. alcanzó una incidencia de la enfermedad clínica del 100% hacia el día 26. Había una diferencia significativa entre la incidencia en los grupos tratados con IDX9054 por vía s.c. e i.n. en comparación con el grupo de control por vía i.n. ($p = 0,02$).

La evolución de la enfermedad pasó por un curso de recaídas y remisiones que empeoró progresivamente con el tiempo. Como no todos los animales de un grupo desarrollaron la enfermedad exactamente al mismo tiempo y la evolución de su enfermedad no estaba, por lo tanto, completamente en fase entre unos y otros, las desviaciones estándares de los valores medios presentados son variables (no se muestra).

En el primer estudio había una diferencia significativa en el comienzo de la EAE del grupo tratado con IDX9054 ($p = 0,0318$), que iba ligeramente retrasado en comparación con el grupo de control. Aunque no había una diferencia estadísticamente significativa de la gravedad de la enfermedad, de la puntuación acumulada ni de la puntuación máxima media entre los grupos, había una tendencia definida a que los grupos tratados con IDX0980 e IDX9054 tuvieran menos pérdida de peso, una enfermedad menos grave y una tasa de mortalidad más baja que los otros grupos (figura 9). En el segundo estudio no había ninguna diferencia estadísticamente significativa respecto al comienzo de la intensidad media de la enfermedad de la EAE, ni en la puntuación acumulada, ni en la puntuación máxima media entre los grupos, pero había una tendencia definida a que los grupos tratados con IDX9054 por vía i.n. y s.c. perdieran menos peso, la enfermedad fuera menos intensa y la tasa de mortalidad fuera más baja que el grupo de control con PBS por vía i.n. La puntuación acumulada y la puntuación máxima media para el grupo tratado con IDX9054 por vía i.n. eran marginalmente menores que en el grupo tratado con IDX9054 por vía s.c.

Este modelo de EAE con MOG es un modelo de enfermedad intensa y las ratas se murieron o bien se sacrificaron debido a las normativas éticas en cada grupo, y se les asignó una puntuación máxima de 5 o 4, respectivamente, a partir de entonces en todos los análisis presentados. La mortalidad era por lo general alta, pero reflejaba la variación natural que experimentamos por norma en el modelo.

En las tablas 3 y 4 se presenta un resumen de todos los datos clínicos, y debajo de cada tabla se presenta un resumen del análisis estadístico.

Tabla 3. Resumen de los datos preclínicos del primer estudio de la EAE

GRUPO	N	Incidencia (%)	Puntuación acumulada	Puntuación acumulada media (DE)	% de mortalidad (n.º/total)	Cambio medio del peso en gramos
0980 s.c.	12	67	543	45 (37)	50,0 (6/12)	+ 8,25
9054 s.c.	12	75	604	50 (38)	58,3 (7/12)	+ 3,88
PBS s.c.	12	100	793	66 (24)	66,6 (8/12)	-2,67
9052 s.c.	12	100	762	64 (24)	66,6 (8/12)	-4,16

Valores de P para el estudio preclínico número uno

IDX0980 frente a PBS

PUNTUACIÓN ACUMULADA $p = 0,2128$

PUNTUACIÓN MÁXIMA $p = 0,2444$

DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD $p = 0,3008$

DÍA DE COMIENZO $p = 0,2873$

INCIDENCIA $p = 0,0285^*$

IDX9054 frente a PBS

PUNTUACIÓN ACUMULADA $p = 0,3548$

PUNTUACIÓN MÁXIMA $p = 0,4490$

DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD $p = 0,1018$

DÍA DE COMIENZO $p = 0,0318^*$

INCIDENCIA $p = 0,0641$

IDX9052 frente a PBS

PUNTUACIÓN ACUMULADA $p = 0,6858$

PUNTUACIÓN MÁXIMA $p = 0,6806$

5 DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD $p = 0,3907$

DÍA DE COMIENZO $p = 0,6123$

INCIDENCIA $p = -$ (ambos el 100%)

Tabla 4. Resumen de los datos preclínicos del segundo estudio de la EAE

GRUPO	N	Incidencia (%)	Puntuación acumulada	Puntuación acumulada media (DE)	% de mortalidad (n.º/total)	Cambio medio del peso en gramos
PBS i.n.	16	100	867	62 (25)	50,0 (7/14)	-8,71
IDX-9054 i.n.	16	68	672	42 (39)	21 (5/16)	+11,44
IDX-9054 s.c.	16	68	726	45 (39)	21 (5/16)	+ 6,3

10

Valores de P para el estudio preclínico número dos

IDX9054 i.n. frente a PBS i.n.

PUNTUACIÓN ACUMULADA $p = 0,20$

PUNTUACIÓN MÁXIMA $p = 0,055$

15 DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD $p = 0,29$

DÍA DE COMIENZO $p = 0,17$

INCIDENCIA $p = 0,02^*$

IDX9054 s.c. frente a PBS i.n.

PUNTUACIÓN ACUMULADA $p = 0,21$

20 PUNTUACIÓN MÁXIMA $p = 0,12$

DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD $p = 0,24$

DÍA DE COMIENZO $p = 0,16$

INCIDENCIA $p = 0,02^*$

25 La EAE inducida con MOG en las ratas DA es un modelo experimental bien caracterizado y muy reproducible. Comparte muchas características con la esclerosis múltiple de su homólogo humano y, como tal, es un modelo apropiado para las pruebas terapéuticas (Gold et al., 2006, Friese et al., 2006).

30 Después de la inmunización con MOG en AIF, los animales sufrieron una parálisis progresiva desde la cola, pasando por las patas traseras, hasta las patas delanteras debido a la degeneración progresiva de la mielina ocasionada por la infiltración de las células inmunitarias inflamatorias en la médula espinal y en el cerebro. La patogenia es recaída crónica, con recuperación parcial de los animales y a continuación recaída con una enfermedad intensificada, y es un resultado de la actividad de los monocitos como de los linfocitos T (citocinas de tipo 1) y de los linfocitos B (anticuerpo).

35 Las sustancias problema son oligonucleótidos con actividad inmunoestimulante demostrada *in vitro*. Su perfil inmunoestimulante específico difiere según la secuencia del oligonucleótido, lo que permite comparar los análisis de

sus efectos *in vivo* sobre las respuestas inflamatorias de interés terapéutico que estén en marcha. El propósito de dos estudios con animales con la EAE era investigar el efecto de IDX9052, IDX9054 e IDX0980 en un modelo de EAE inducida con MOG con recaídas y remisiones en las ratas DA.

5 El tratamiento con todos los oligonucleótidos problema, o solo con el vehículo, no provocó ningún efecto adverso ni fisiológico ni de conducta en las ratas destinatarias. El tratamiento se inició justo antes de la primera crisis de la enfermedad, para dejar primero que la enfermedad se desarrolle con normalidad, pero a continuación suprimir la cascada proinflamatoria en marcha. Las administraciones adicionales se programaron para que coincidieran con la altura de la enfermedad y el comienzo de la fase de la enfermedad clínica. La recuperación desde este primer periodo de EAE fue más pronunciada en los grupos tratados con IDX0980 y con IDX9054, y el desarrollo de las crisis clínicas posteriores fue menos pronunciado en el grupo tratado con IDX0980. Todos los parámetros medidos se redujeron en los grupos tratados con IDX0980 e IDX9054 en comparación con los grupos tratados con el vehículo.

10 La SEQ ID n.º 5 (IDX9052) era un inductor fuerte del IFN- α / β en los esplenocitos de rata, pero no mostró ninguna reducción de la intensidad de la enfermedad en el modelo de rata con EAE. Así pues, la reducción de la intensidad de la enfermedad observada en el modelo de rata con EAE tras el tratamiento con IDX9054 e IDX0980 no se puede correlacionar solo con la producción de IFN- β . Además, los resultados obtenidos con la SEQ ID n.º 2 (IDX9054) indican que este compuesto tiene un efecto terapéutico, tanto por vía s.c. como i.n., sobre la EAE por MOG en las ratas DA.

Ejemplo 4: Reducción *in vitro* de CD49d en las muestras de pacientes

20 Para investigar si los compuestos de la invención pueden reducir la expresión de CD49d, los inventores utilizaron CMNSP aisladas de pacientes con EMRR para estudiar la expresión de CD49d tras la estimulación con los compuestos candidatos.

Material y métodos

25 Las CMNSP de pacientes con EMRR (n = 9) se obtuvieron de un Vacutainer™ BD CPT (Becton Dickinson). Las células se incubaron inmediatamente a 37 °C en un volumen de 500 μ l de medio RPMI completo (que contiene SBF al 10%, PenStrep al 1%, L-glutamina a 2 mM, HEPES a 10 mM y piruvato de sodio a 1 mM) en placas de 48 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml y se trataron con 1, 10 y 25 μ M de cada uno de los compuestos oligonucleotídicos (tabla 1). Las células incubadas con los oligonucleótidos se recogieron al cabo de 48 h, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS complementado con SBF al 2%. Las células se tiñeron con dos conjuntos diferentes de mezclas de anticuerpo conjugado a fluorocromo; (1) APC con anti-CD3, PE con anti-CD49d y (2) PE Cy7 con anti-CD19, APC con anti-CD49d, durante 30 min a 4 °C. Los anticuerpos se compraron a Becton Dickinson. Después de la tinción, las células se lavaron en PBS y posteriormente se analizaron mediante FACS con el bioanalizador FACSArray (Becton Dickinson).

Resultados

35 Las CMNSP aisladas de pacientes con EMRR mostraban una disminución de CD49d en los linfocitos T de una manera dependiente de la dosis tras la estimulación con los oligonucleótidos (figura 10).

Se observó una disminución en la expresión de CD49d en las células en las CMNSP aisladas de los pacientes con EMRR tratados con los compuestos de la invención. Estas propiedades de los compuestos de la invención pudieron reducir la trans migración y, con ello, la afluencia de las células al SNC.

Ejemplo 5: Reducción *in vitro* de los receptores de las quimiocinas en las muestras de pacientes

40 La afluencia de las células mononucleares sanguíneas (p. ej., linfocitos T, linfocitos B, monocitos) al SNC desempeña una función crucial en la patogenia de la EM. Por lo tanto, el bloqueo o la reducción de la afluencia sería beneficioso para el tratamiento de la EM. Los receptores de las quimiocinas como CCR5 (CD195), CCR2 (CD192) e CXCR3 (CD183) se expresan en las células mononucleares e intervienen en la atracción de las células al sitio de la inflamación. Para investigar si los compuestos de la invención pueden reducir la expresión de dichos receptores de las quimiocinas, los inventores estimularon las CMNSP aisladas de los pacientes con EMRR con los compuestos de la invención.

Material y métodos

50 Las CMNSP de pacientes con EMRR (n = 3) se aislaron con un Vacutainer™ BD CPT. Las células se incubaron inmediatamente a 37 °C en un volumen de 500 μ l de medio RPMI completo (que contiene SBF al 10%, PenStrep al 1%, L-glutamina a 2 mM, HEPES a 10 mM y piruvato de sodio a 1 mM) en placas de 48 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml y se trataron con 1, 10 y 25 μ M de cada compuesto de la invención. Las células incubadas con los oligonucleótidos se recogieron después de 48 h, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS complementado con SBF al 2%. Las células se tiñeron con tres series diferentes de mezclas de anticuerpos conjugados a

fluorocromos; (1) PE-Cy-7 con anti-CD3, APC-Cy7 con anti-CCR5, Alexa Fluor 647 con anti-CCR2, PE con anti-CXCR3, (2) PE-Cy7 con anti-CD19, APC-Cy7 con anti-CCR5, Alexa Fluor 647 con anti-CCR2, PE con anti-CXCR3 y (3) PE-Cy7 con anti-CD14, APC-Cy7 con anti-CCR5, Alexa Fluor 647 con anti-CCR2, PE con anti-CXCR3, durante 30 min a 4 °C. Los anticuerpos se compararon a Becton Dickinson. Después del lavado en PBS, las células se analizaron en el citómetro de flujo FACSArray (Becton Dickinson).

Resultados

Las CMNSP aisladas de los pacientes con EMRR (n = 3) mostraban una disminución de CXCR3 sobre los linfocitos T (positivos para CD3) después de la estimulación con los compuestos de la invención, en especial con IDX9045 (figura 11). El CCR5 también disminuyó sobre los linfocitos T después del tratamiento con los oligonucleótidos, en especial con el IDX9022 (datos sin mostrar).

Las CMNSP aisladas de los pacientes con EMRR (n = 3) mostraban una disminución de CXCR3 sobre las células que expresan CD19. Los oligonucleótidos que mostraban el efecto represor más potente sobre este receptor eran IDX9038, IDX9054, IDX9058, IDX9045, IDX9004 e IDX0980 (figura 12).

Las CMNSP aisladas de los pacientes con EMRR (n = 3) mostraban una disminución de CXCR3, CCR5 y CCR2 en las células que expresan CD14. Los oligonucleótidos que muestran el efecto represor más potente sobre CXCR3, CCR5 y CCR2 se muestran en las figuras 13, 14, y 15 A y B, respectivamente.

Se observó una disminución de la expresión de receptores de quimiocinas (CCR5, CXCR3, CCR2) en los linfocitos T, en los linfocitos B y en los monocitos entre las CMNSP aisladas de los pacientes con EMRR tratados con los compuestos de la invención. Estas propiedades de los compuestos de la invención podrían desempeñar una función importante a la hora de reducir la migración de estas células hacia el SNC.

Ejemplo 6: Reducción de la quimiotaxia de los leucocitos aislados de los pacientes con EMRR.

MCP-1 y RANTES son dos quimiocinas potentes para la atracción de las células mononucleares sanguíneas, en particular los monocitos, los linfocitos T y los linfocitos B, hacia el sitio de la inflamación. La quimiotaxia de las células mononucleares sanguíneas hacia MCP-1 y RANTES está mediada principalmente por los receptores CCR2 y CCR5, respectivamente. El objetivo de este estudio era demostrar que la disminución de la expresión de CCR2 y CCR5 debida a los compuestos de la invención como se muestra en el ejemplo 5 puede, realmente, reducir la migración de las células mononucleares.

Material y métodos

Se investigó la quimiotaxia de las células mononucleares sanguíneas con el ensayo colorimétrico de quimiotaxia QCM™ (Millipore, Temecula, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las CMNSP se aislaron de pacientes con EMRR mediante el uso de Vacutainer™ BD CPT y se trataron con 1, 10 y 25 µM de los compuestos de la invención del mismo modo que se describió en el ejemplo 5. Después de 48 h, las células se lavaron y se transfirieron (3×10^5 células en 250 µl de medio) a los insertos de la parte superior de un ensamblaje de una placa de migración celular de 24 pocillos que tiene un tamaño de poro de 3 µm. A continuación se añadieron a la cámara inferior 300 µl de medio que contiene las quimiotaxinas MCP-1 (10 ng/ml) y RANTES (10 ng/ml). A continuación se dejó que las células migraran a través del filtro hacia la quimiotaxina durante 16 h a 37 °C en un incubador de cultivo celular humidificado (Thermo Scientific) con CO₂ al 5% en aire. A partir de entonces, las células de la cámara inferior, a saber, las células migradas, se detectaron mediante incubación con la tinción de viabilidad celular WST-1 durante 1 h seguido de la cuantificación por absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (Tecan, Männedorf, Suiza).

Resultados

Las CMNSP aisladas de dos pacientes diferentes con EMRR tratados con los compuestos de la invención (IDX9045, IDX9054, IDX0980) mostraban menos migración hacia las quimiotaxinas que las células sin tratar en un ensayo de migración funcional (figura 16A-B).

Esto indica que la reducción de la migración celular se debe a una menor expresión de los receptores. Existen razones para predecir que estos resultados también reflejan un contexto *in vivo*, que en consecuencia conduce a una menor quimiotaxia de las células hacia el sistema nervioso central.

Ejemplo 7: Reducción del VEGF *in vitro* en las muestras de pacientes

Las lesiones activas de la EM se caracterizan por el mal funcionamiento de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que apunta a que la alteración de la permeabilidad de los vasos interviene en la patogenia de la enfermedad. En los pacientes con EM se ha notificado que el VEGF induce la permeabilidad de los vasos sanguíneos, con lo que se incrementa la afluencia de las células autoagresivas al SNC (Proescholdt MA et al., 2002). Para investigar si los

compuestos de la invención pueden reducir la producción del VEGF, los inventores utilizaron las CMNSP aisladas de pacientes con EMRR para estudiar la producción del VEGF tras la estimulación con los compuestos de la invención.

Material y métodos

5 Las CMNSP se aislaron de pacientes con EMRR (n = 6-11) con el Vacutainer™ BD CPT. Las células se incubaron inmediatamente a 37 °C en un volumen de 500 µl del medio RPMI completo en placas de 48 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml y se trataron con 1, 10 y 25 µM de cada compuesto de la invención. Al cabo de 48 h, los sobrenadantes se analizaron para detectar la presencia del VEGF mediante una micromatriz de perlas para citometría (BD™ CBA, Becton Dickinson).

Resultados

10 Las CMNSP aisladas de los pacientes con EMRR mostraban una reducción significativa del VEGF en los sobrenadantes celulares después de la estimulación con IDX9038, IDX9045, IDX9004 e IDX0980 (figura 17). Sin embargo, IDX9022, IDX9058, IDX9054, IDX9060, IDX0150 e IDX9052 no redujeron el VEGF en el sobrenadante celular (datos sin mostrar).

15 Se observó una reducción del VEGF en el sobrenadante celular de las células tratadas con los compuestos de la invención. Esta propiedad de los compuestos de la invención se cree que reduce la permeabilidad vascular de la BHE y, gracias a ello, se impide la infiltración de las células inmunitarias al SNC.

Ejemplo 8: Inducción *in vitro* del IFN-β en las muestras de pacientes

Los inventores utilizaron sangre de pacientes con EMRR para analizar la capacidad de inducción *in vitro* del IFN-β que tienen los diferentes compuestos candidatos.

20 Material y métodos

Se aislaron las CMNSP de pacientes con EMRR (n = 6) con el Vacutainer™ BD CPT. Las células se incubaron inmediatamente a 37 °C en un volumen de 500 µl de medio RPMI completo en placas de 48 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml y se trataron con 1, 10 y 25 µM de cada uno de los compuestos oligonucleotídicos. Al cabo de 48 h, los sobrenadantes se analizaron para detectar la producción del IFN-β con un kit de ELISA para el IFN-β (Invitrogen).

Resultados

30 Las CMNSP aisladas de pacientes con EMRR mostraban una producción significativa del IFN-β en el sobrenadante celular después de la estimulación con IDX9058, IDX9045, IDX9004, IDX9054, IDX9060 e IDX0980 después de 48 h (figura 18). El IDX9022, el IDX9038 y el IDX9052 no inducían una producción significativa del IFN-β en el sobrenadante (datos sin mostrar). El IDX0150 no mostraba ninguna producción en absoluto del IFN-β (datos sin mostrar).

35 Se observó un incremento de la producción de IFN-β en el sobrenadante celular de las CMNSP aisladas de pacientes con EMRR tratados con los compuestos de la invención. Esta propiedad de los compuestos de la invención para desencadenar la producción del IFN-β podría contribuir a disminuir la inflamación debido a los efectos beneficiosos conocidos que tiene esta citocina, puesto que se utiliza en la actualidad en el tratamiento de la EMRR.

40 En general, los resultados de los experimentos realizados por los inventores indican que los oligonucleótidos pueden ser eficaces en una situación *in vivo* cuando una inhibición o reducción de células mononucleares en el sistema nervioso central podría ser beneficiosa para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias del SNC. Este efecto beneficioso de los compuestos de la invención puede estar mediado por la disminución de la expresión de al menos un marcador de la superficie celular o del VEGF.

Referencias

FDA News P04-107, November 23, 2004.

Friese, M A *et al.*, The value of animal models for drug development in multiple sclerosis, *Brain*, 2006;129 (Pt 8):1940-52.

Gold *et al.*, Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research, *Brain*, 2006;129 (Pt 8):1953-71.

Hafler, D A, Multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 2004.

Kerkmann, M. *et al.*, Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells, *J Biol Chem*, 2005; 280(9):8086-93.

Wikström, F H *et al.*, Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells., *J Virol*. 2007; 81(10):4919-27.

Proescholdt M A. *et al*, Vascular endothelial growth factor is expressed in multiple sclerosis plaques and can induce inflammatory lesions in experimental allergic encephalomyelitis rats., *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002; 61(10):914-25

Trebst C, Ransohoff RM. Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges, *Arch Neurol*. 2001;58(12):1975-80.

Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis, *Nat Rev Immunol.*, 2009;9(6):440-7.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Index Pharmaceuticals AB Lisa Bandholtz Alexander Gielen Arezou Zargari Oliver Von Stein Lars-Göran Axelsson	
10	<120> Métodos y compuestos para el tratamiento de la esclerosis múltiple <130> 58315PC	
15	<160> 10 <170> PatentIn versión 3.3	
20	<210> 1 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Artificial	
30	<220> <221> Modificación con fosforotioato <222> (1) .. (13) <223> G*G*G*TCGCAGC*T*G*G	
	<400> 1 gggtcgcagc tgg	13
35	<210> 2 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Artificial	
45	<220> <221> Modificación con fosforotioato <222> (1) .. (15) <223> G*G*G*GTCGTCTGC*G*G*G	
50	<400> 2 ggggtcgtct gcggg	15
55	<210> 3 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Artificial	
	<220> <221> Modificación con fosforotioato <222> (1) .. (21)	

<223> T*C*G*TCGTTGCGCCGATCG*T*C*C

<400> 3
tcgtcgttcg gccgatcgtc c 21

5 <210> 4
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Artificial

15 <220>
<221> Modificación con fosforotioato
<222> (1) .. (15)
<223> G*G*G*GTCGCAGCT*G*G*G

20 <400> 4
ggggtcgcag ctggg 15

<210> 5
<211> 14
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Artificial

30 <220>
<221> Modificación con fosforotioato
<222> (1) .. (14)
<223> G*G*G*GTCGTCTG*C*G*G

35 <400> 5
ggggtcgtct gcgg 14

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Artificial

45 <220>
<221> Modificación con fosforotioato
<222> (1) .. (22)
<223> T*C*G*TCGTTCTGCCATCGTC*G*T*T

50 <400> 6
tcgtcgttct gccatcgteg tt 22

<210> 7
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> Artificial

60 <220>
<223> Artificial

	<220>		
	<221> Modificación con fosforotioato		
	<222> (1).. (16)		
5	<223> G*A*T*CGTCCGTCGG*G*G*G		
	<400> 7		
	gacgtccgt cggggg		16
10	<210> 8		
	<211> 15		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Artificial		
	<220>		
	<221> Modificación con fosforotioato		
20	<222> (1) .. (15)		
	<223> G*G*G*GATCGTCCG*G*G*G		
	<400> 8		
	ggggatcgtc cgggg		15
25	<210> 9		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Artificial		
	<220>		
	<221> Modificación con fosforotioato		
35	<222> (1) .. (19)		
	<223> G*G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G*C		
	<400> 9		
40	ggaacagttc gtccatggc		19
	<210> 10		
	<211> 20		
	<212> ADN		
45	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Artificial		
50	<220>		
	<221> Modificación con fosforotioato		
	<222> (1) .. (20)		
	<223> G*G*GGGACGATCGTCG*G*G*G*G		
55	<400> 10		
	gggggacgat cgtcgggggg		20

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado elegido entre SEQ ID n.º 1 [IDX9045], SEQ ID n.º 2 [IDX9054], SEQ ID n.º 4 [IDX9004], SEQ ID n.º 8 [IDX9060] y SEQ ID n.º 5 [IDX9052].
- 5 2. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos un nucleótido tiene una modificación del esqueleto de fosfatos.
3. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la modificación del esqueleto de fosfatos es una modificación con fosforotioato o fosforoditioato.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, que además comprende un excipiente o vehículo farmacológicamente compatible y fisiológicamente aceptable, elegido entre solución salina, liposomas, tensioactivos, compuestos mucoadherentes, inhibidores enzimáticos, sales biliares, potenciadores de la absorción, ciclodextrinas, o una combinación de los mismos.
- 15 6. La utilización de un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado elegido entre SEQ ID n.º 1 [IDX9045], SEQ ID n.º 2 [IDX9054], SEQ ID n.º 3 [IDX9038], SEQ ID n.º 7 [IDX9058], SEQ ID n.º 6 [IDX9022], SEQ ID n.º 4 [IDX9004], SEQ ID n.º 8 [IDX9060] y SEQ ID n.º 5 [IDX9052] para fabricar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o alivio de la esclerosis múltiple.
- 20 7. La utilización de acuerdo con la reivindicación 6, en donde al menos un nucleótido tiene una modificación del esqueleto de los fosfatos.
8. La utilización de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la modificación del esqueleto de fosfatos es una modificación con fosforotioato o fosforoditioato.
9. La utilización de un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado de acuerdo con la SEQ ID n.º 9 [IDX0150] para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o alivio de la esclerosis múltiple.
- 25 10. La utilización de un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado de acuerdo con la SEQ ID n.º 10 [IDX0980] para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o alivio de la esclerosis múltiple.
11. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde dicho oligonucleótido se administra en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la afluencia de las células mononucleares y/o autoagresivas al sistema nervioso central por la disminución de la expresión de al menos un marcador de la superficie celular.
- 30 12. La utilización de un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado elegido entre SEQ ID n.º 1 [IDX9045], SEQ ID n.º 2 [IDX9054], SEQ ID n.º 3 [IDX9038], SEQ ID n.º 7 [IDX9058], SEQ ID n.º 6 [IDX9022], SEQ ID n.º 4 [IDX9004], SEQ ID n.º 8 [IDX9060] y SEQ ID n.º 5 [IDX9052] para fabricar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o alivio de una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, en donde dicho oligonucleótido se administra en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la afluencia de las células mononucleares y/o autoagresivas al sistema nervioso central por la disminución de la expresión de al menos un marcador de la superficie celular.
- 35 13. La utilización de acuerdo con la reivindicación 12, en donde al menos un nucleótido tiene una modificación del esqueleto de fosfatos.
14. La utilización de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la modificación del esqueleto de fosfatos es una modificación con fosforotioato o fosforoditioato.
- 40 15. La utilización de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde dicho al menos un marcador de la superficie celular se elige entre CD49d, CXCR3 (CD183), CCR2 (CD192) y CCR5 (CD195).
16. La utilización de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el oligonucleótido se elige entre SEQ ID n.º 1 [IDX9045], SEQ ID n.º 2 [IDX9054]; SEQ ID n.º 7 [IDX9058]; SEQ ID n.º 3 [IDX9038].
17. La utilización de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el oligonucleótido es la SEQ ID n.º 1 [IDX9045].
- 45 18. La utilización de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho al menos un marcador de la superficie celular es CD49d y el oligonucleótido se elige entre SEQ ID n.º 3 [IDX9038] o SEQ ID n.º 7 [IDX9058].
19. La utilización de acuerdo con la reivindicación 6 o 12, en donde dicho oligonucleótido se administra en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la afluencia de las células mononucleares y/o autoagresivas al sistema nervioso

central por la reducción de la producción del VEGF.

20. La utilización de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el oligonucleótido se elige de SEQ ID n.º 1 [IDX9045].

5 21. La utilización de un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado de acuerdo con la SEQ ID n.º 10 [IDX0980], para fabricar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o alivio de una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, en donde dicho oligonucleótido se administra en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la afluencia de las células mononucleares y/o autoagresivas al sistema nervioso central por la reducción de la producción del VEGF.

10

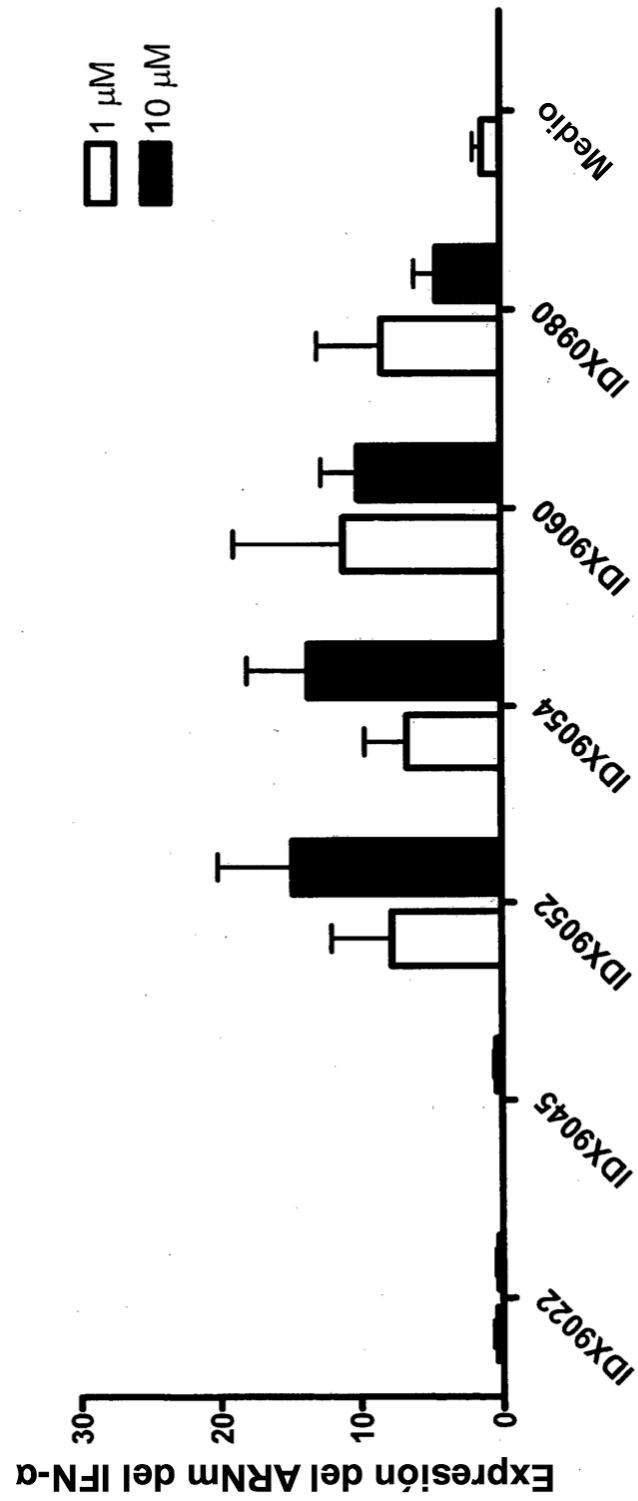


Fig. 1

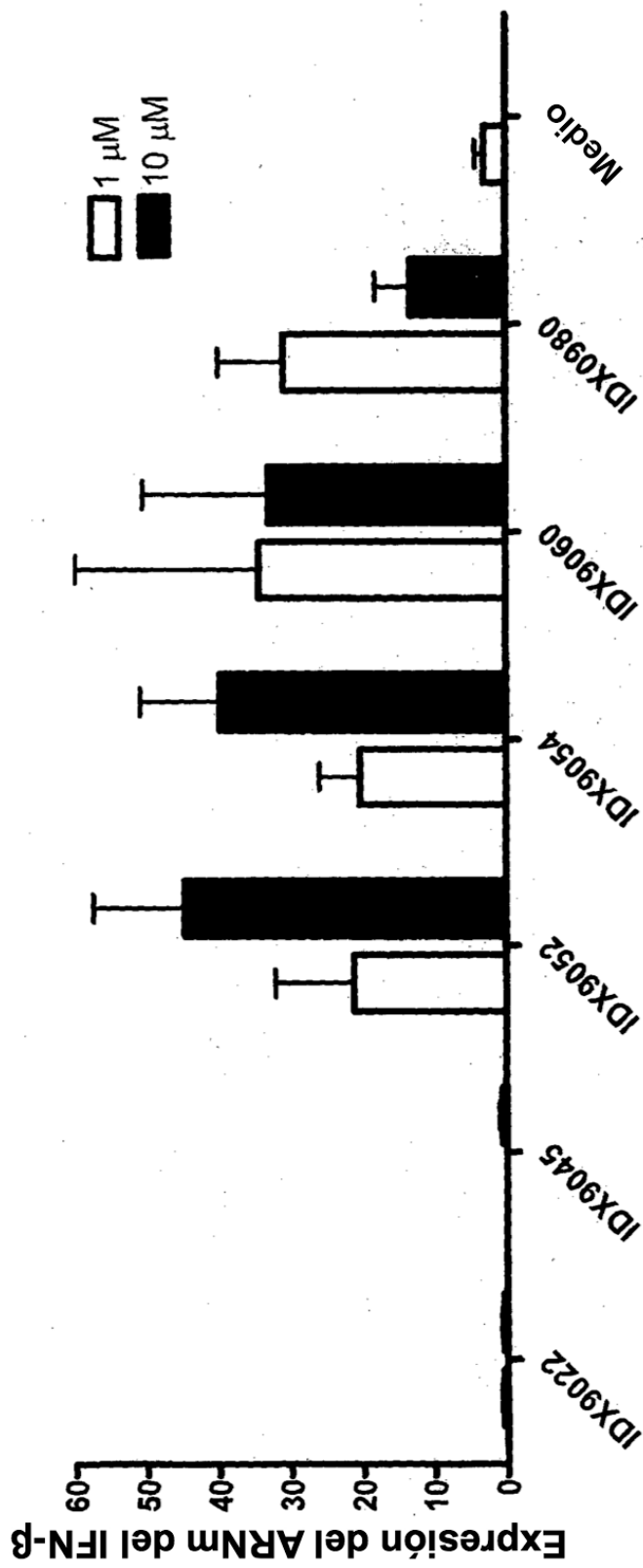
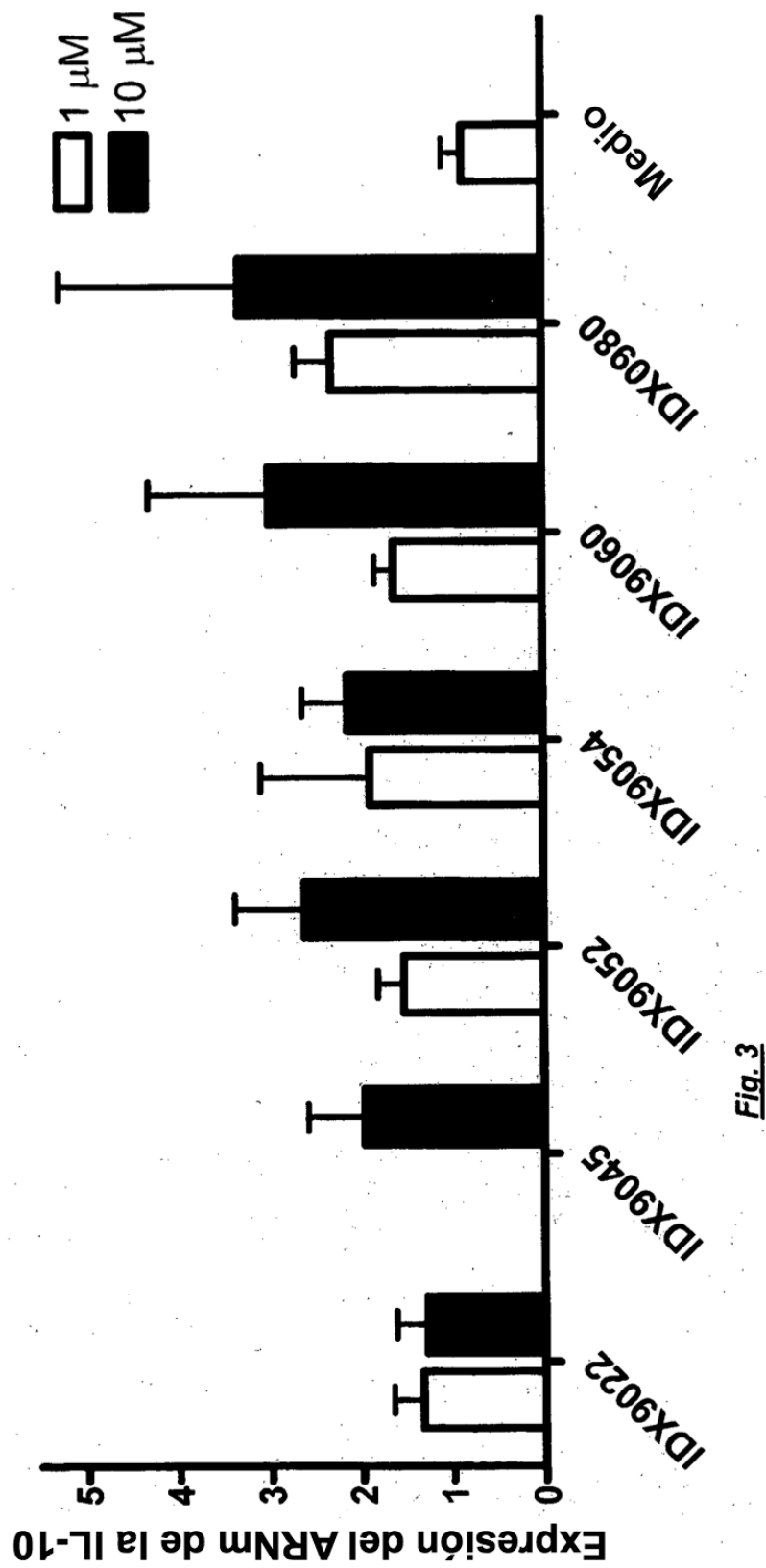


Fig. 2



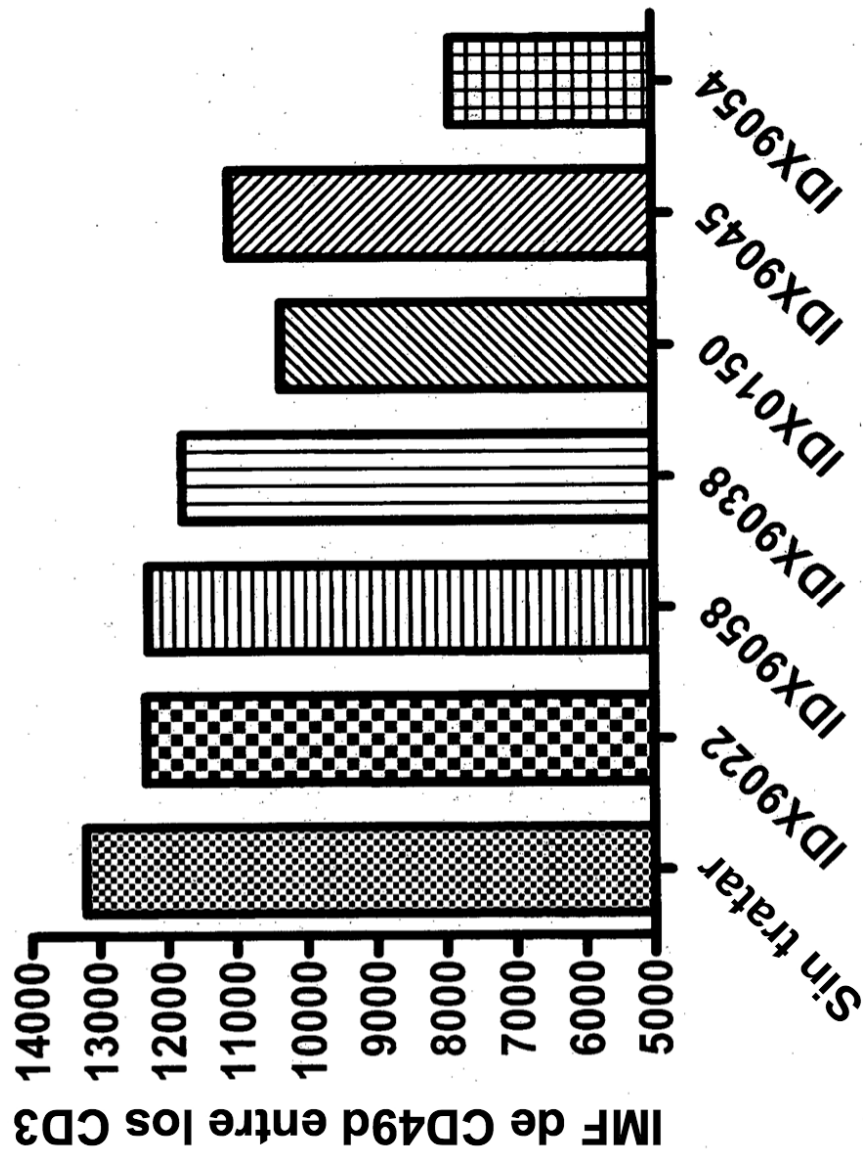


Fig. 4

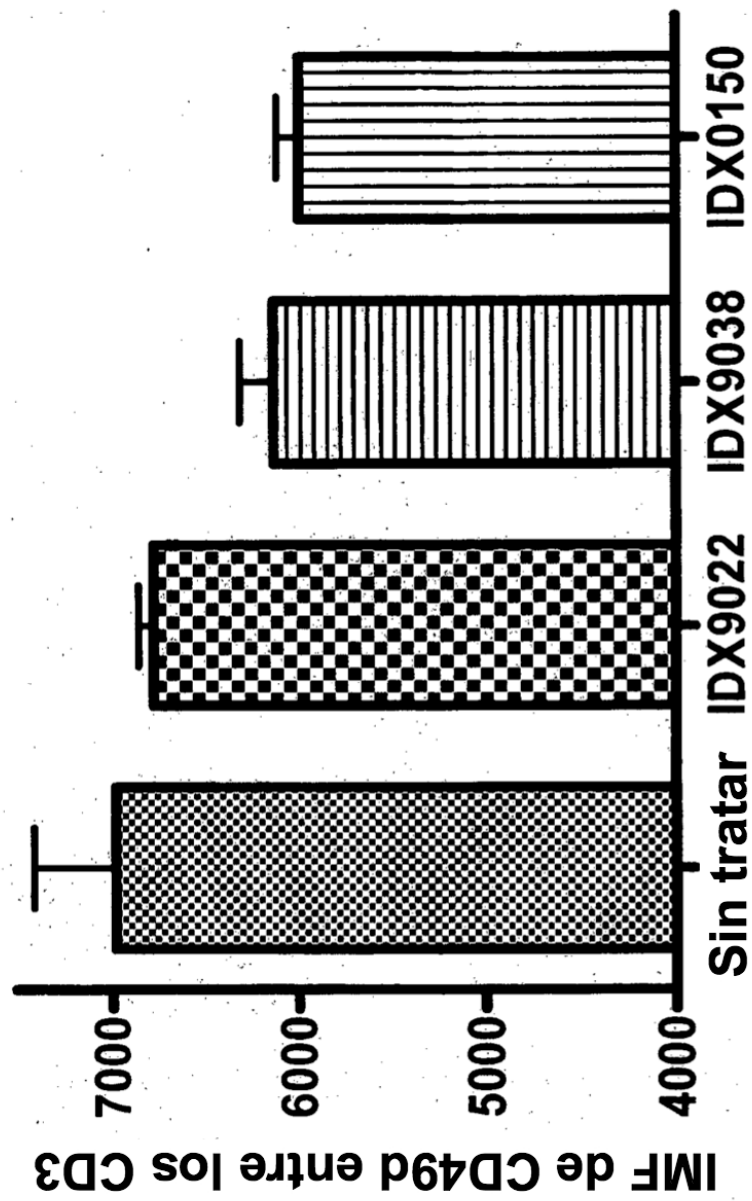


Fig. 5

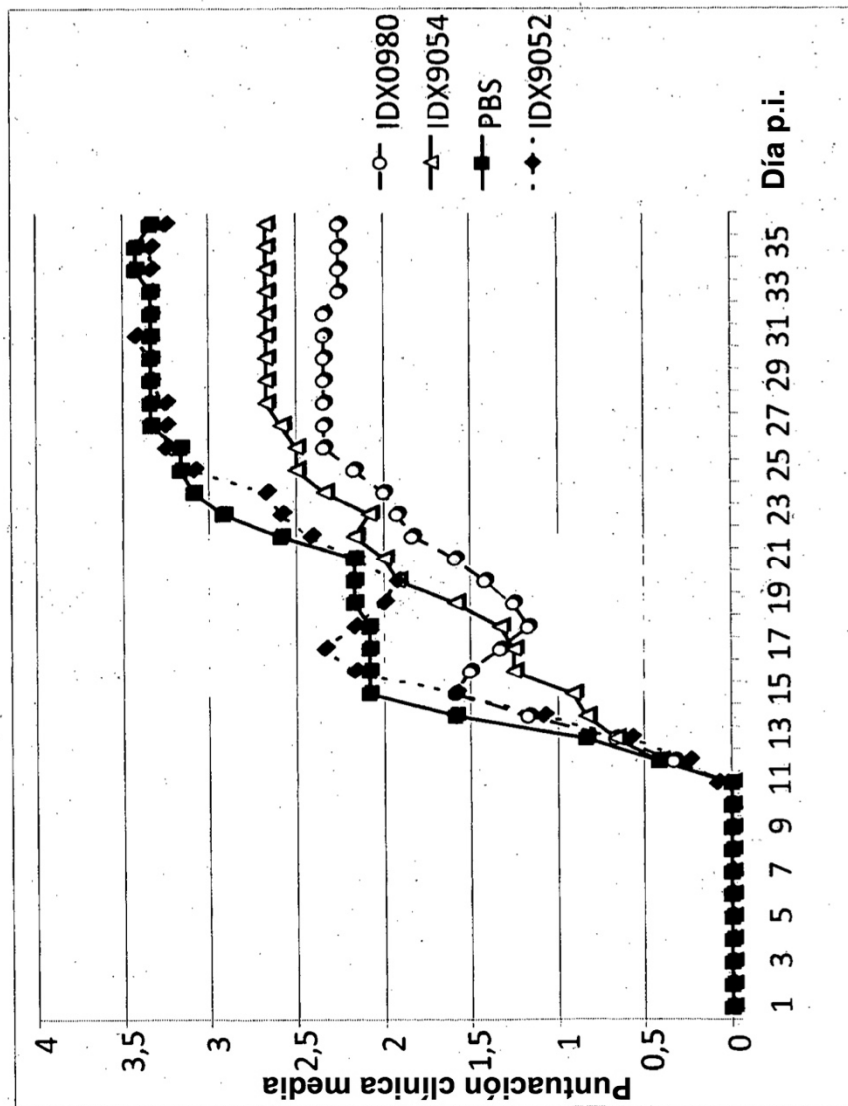


Fig. 6

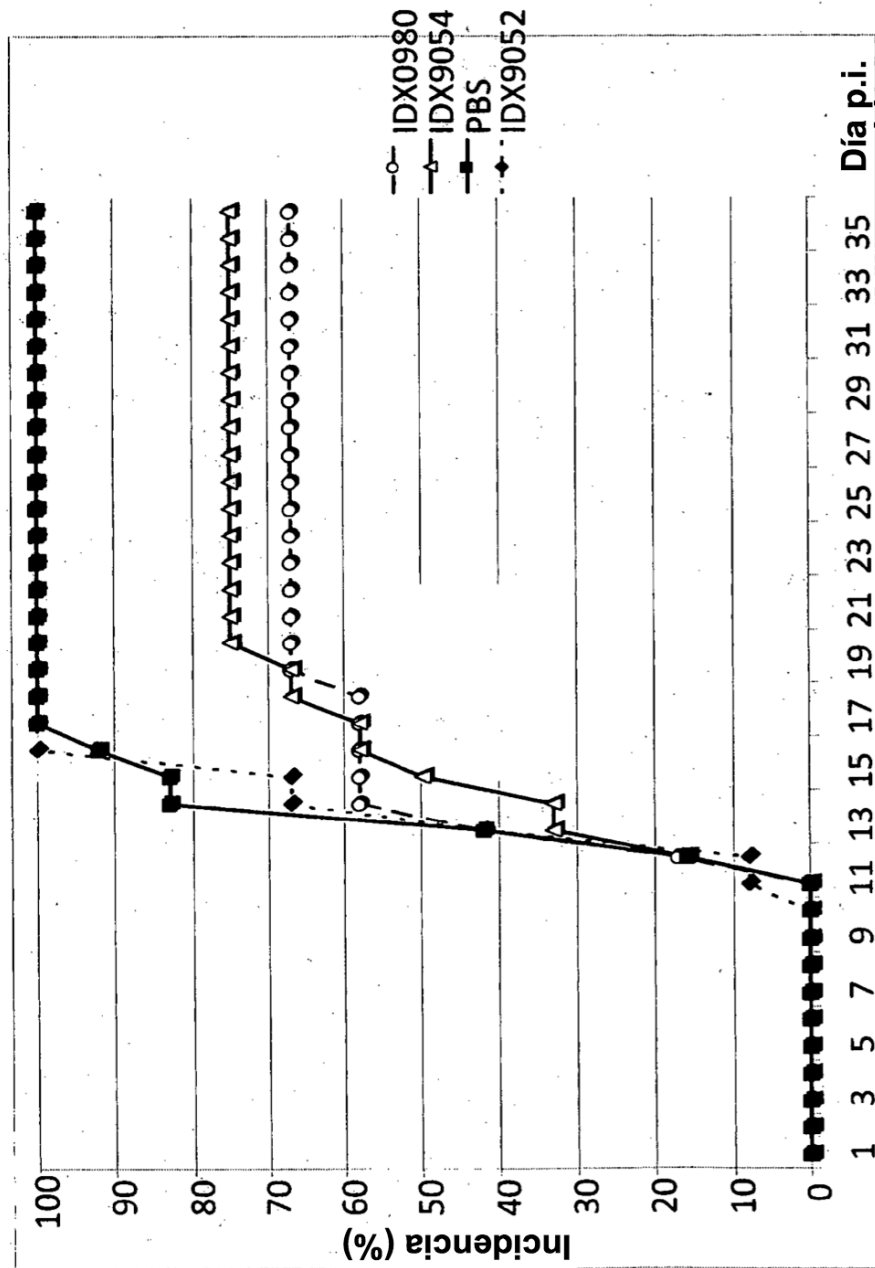


Fig. 7

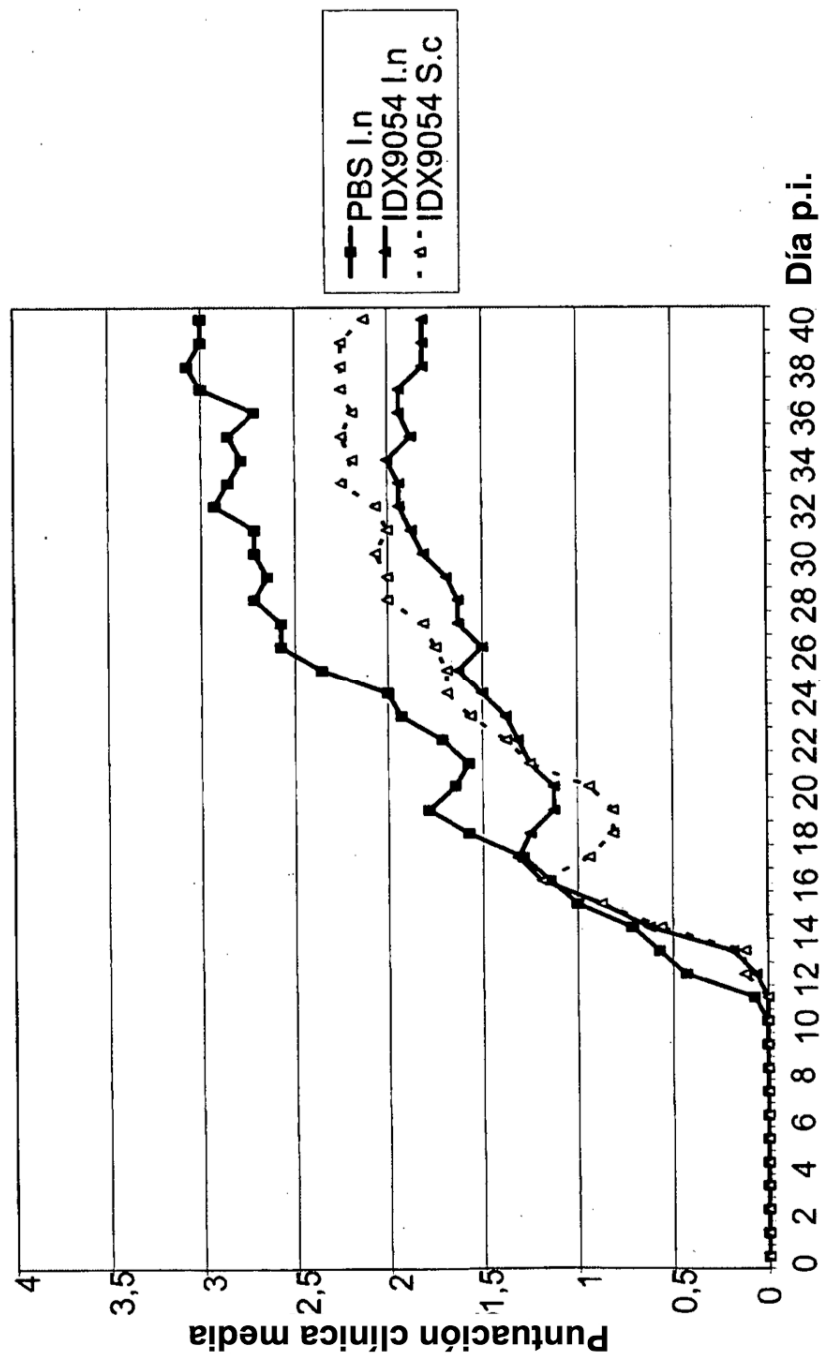


Fig. 8

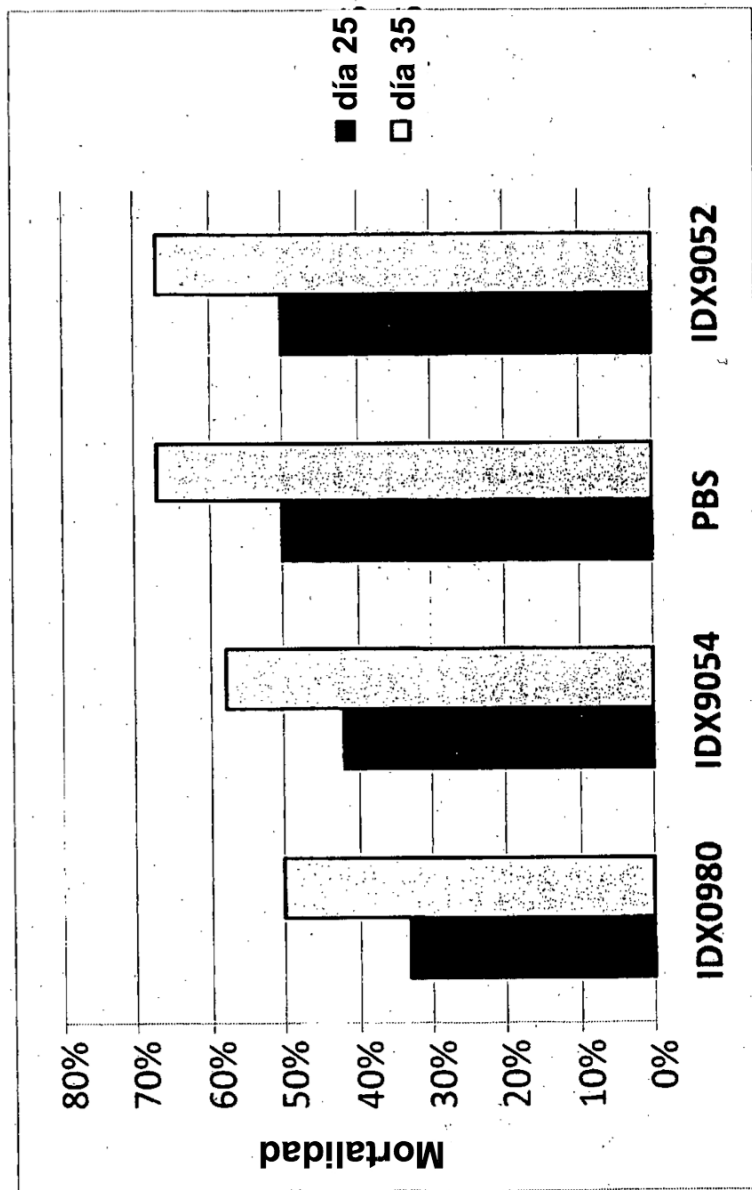
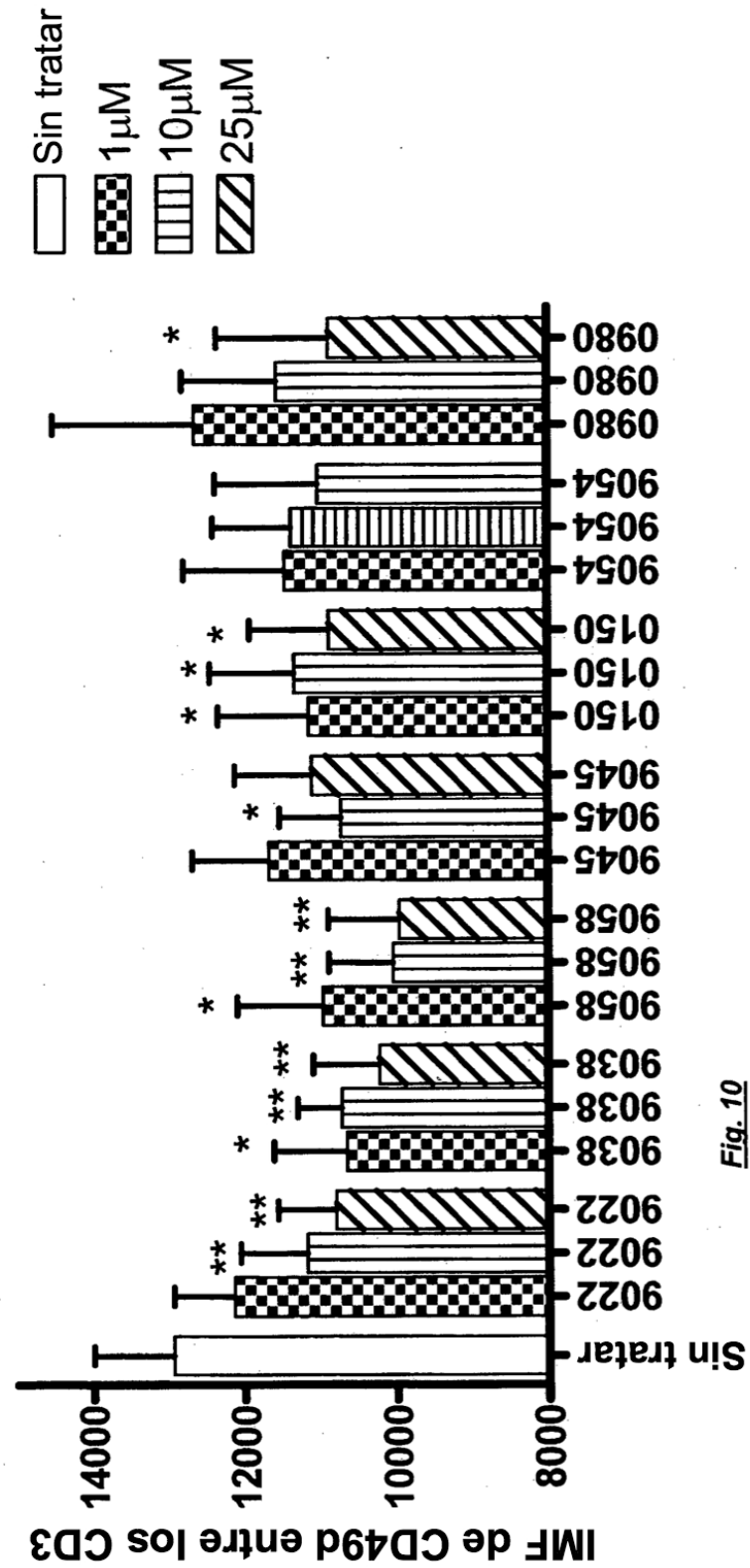


Fig. 9



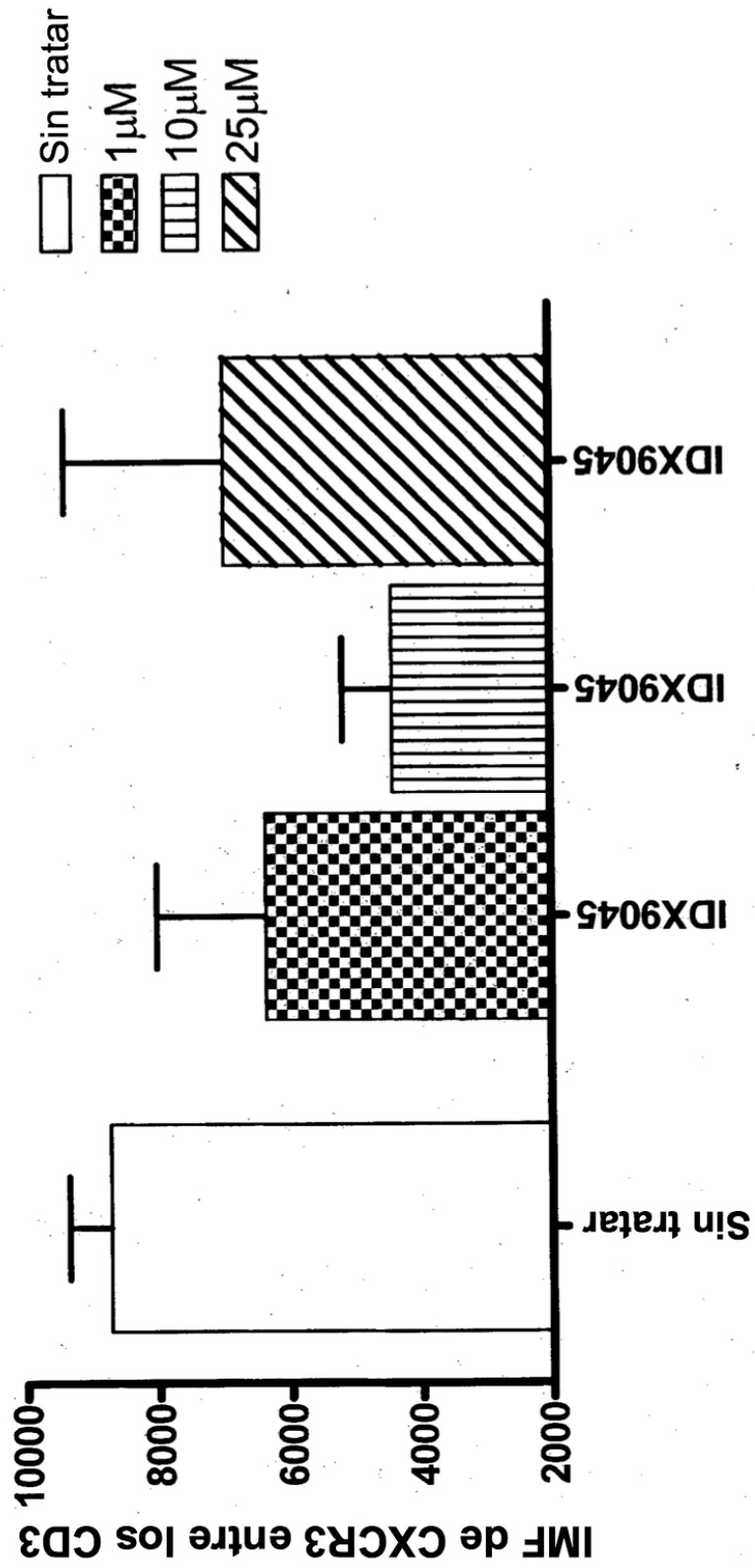


Fig. 11



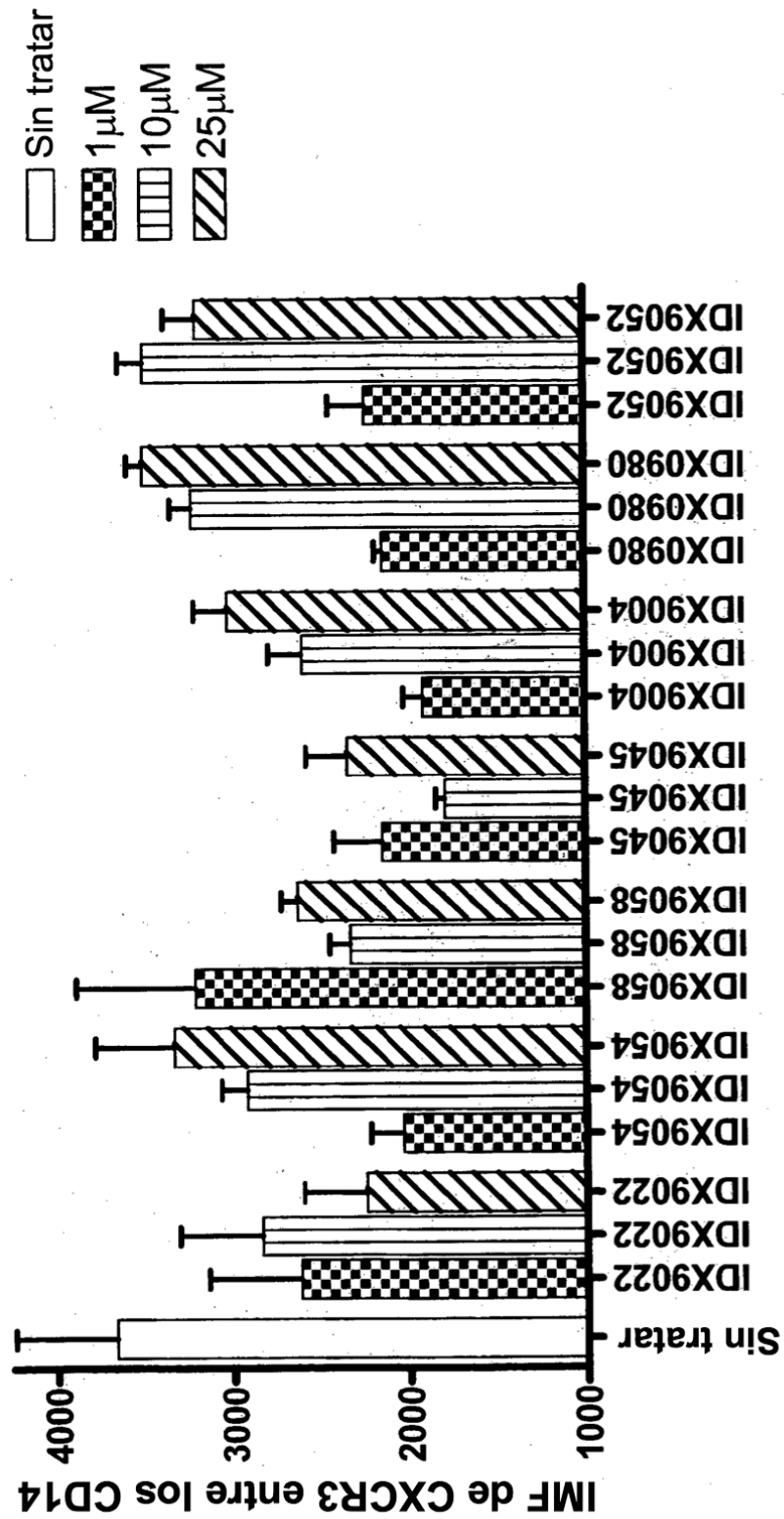


Fig. 13

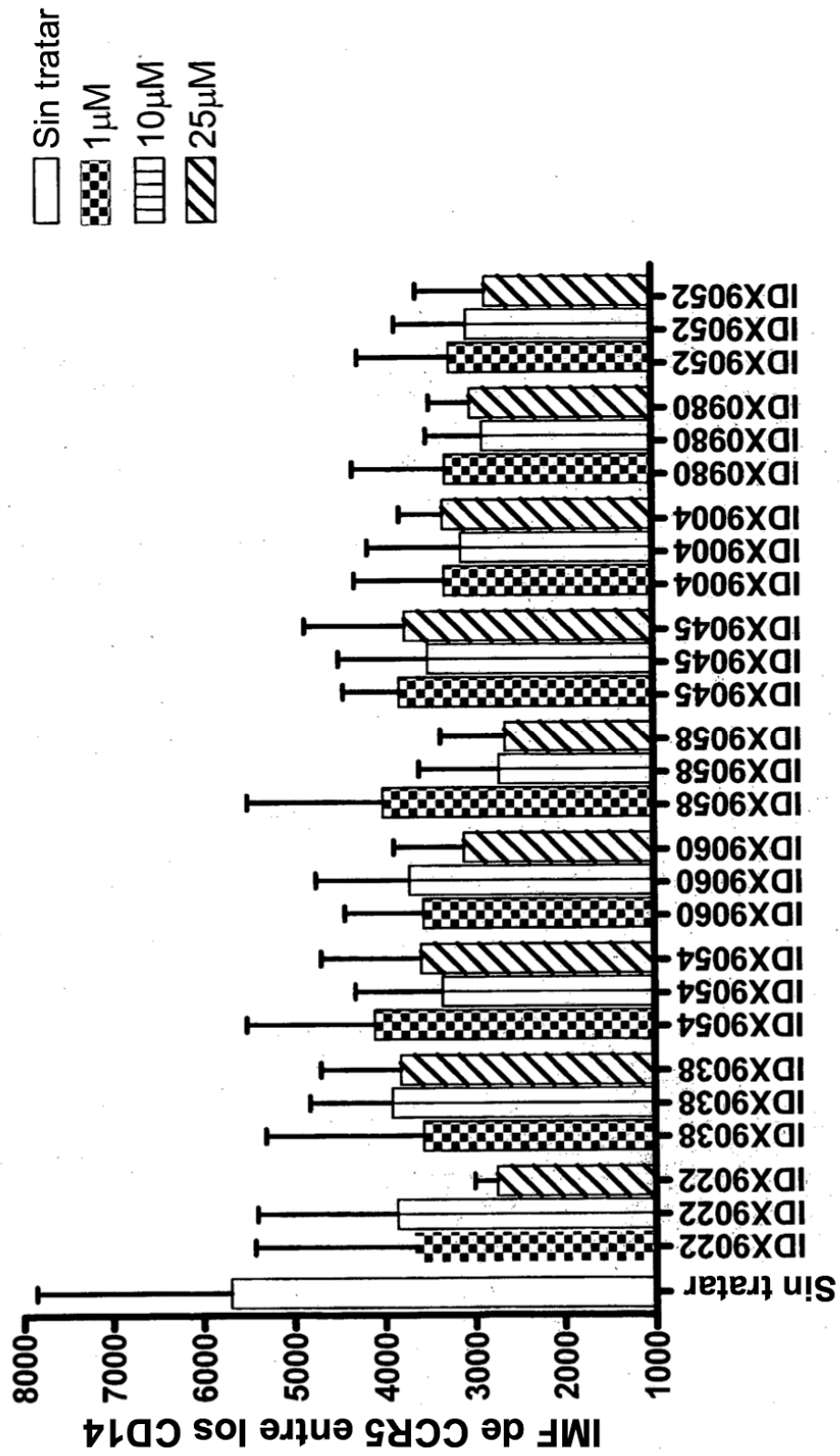


Fig. 14

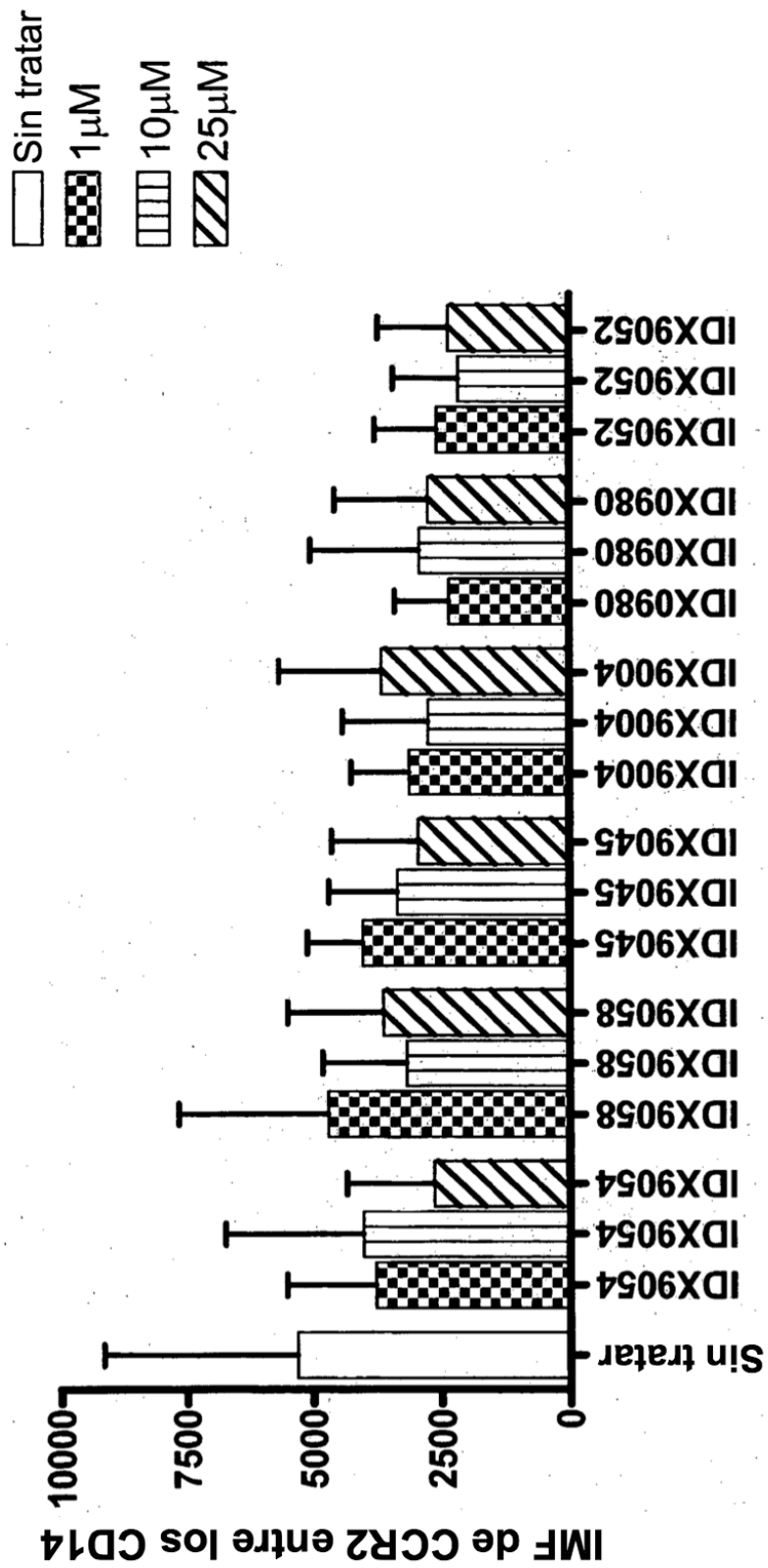


Fig. 15a

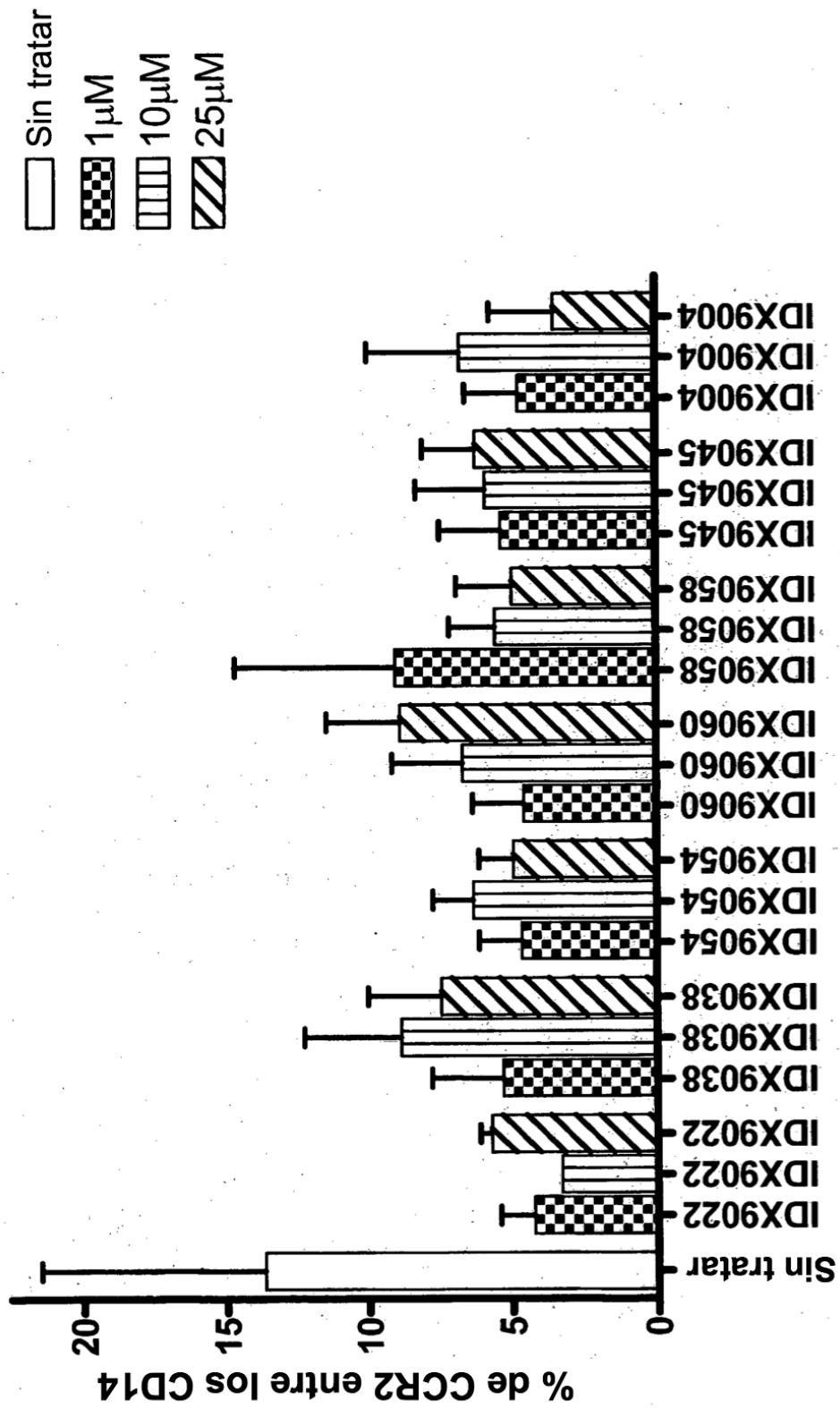


Fig. 15b

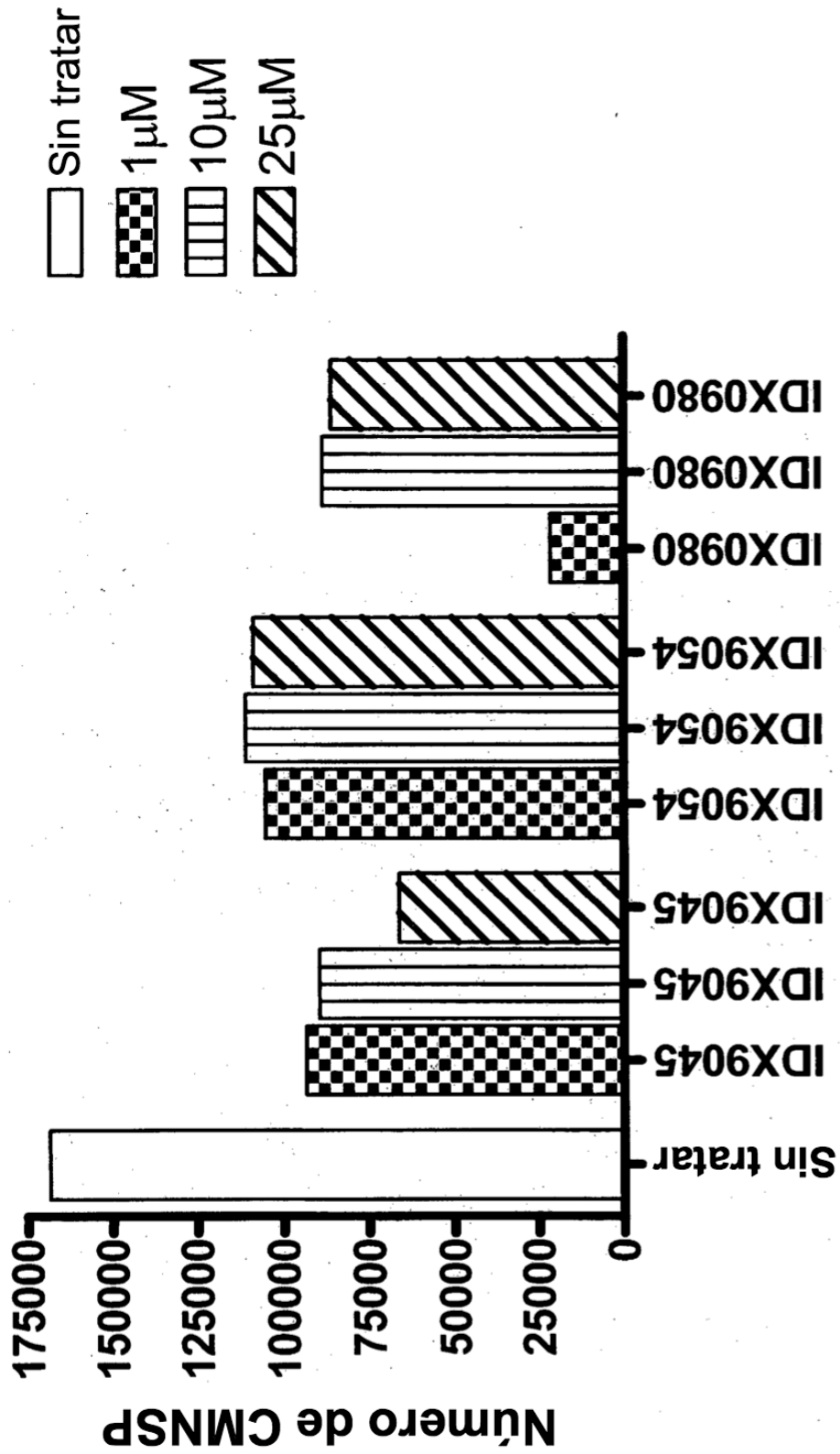


Fig. 16a

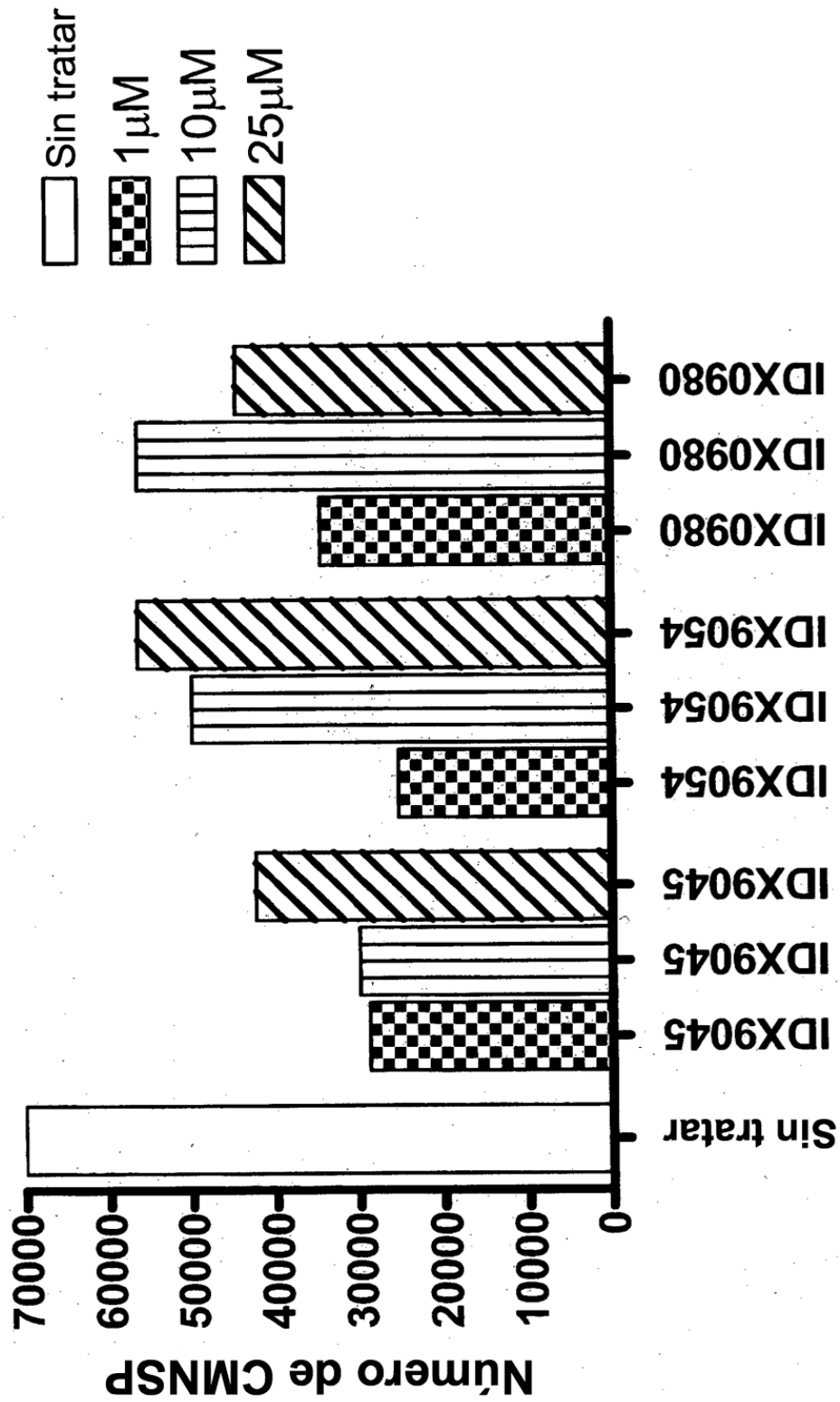


Fig. 16b

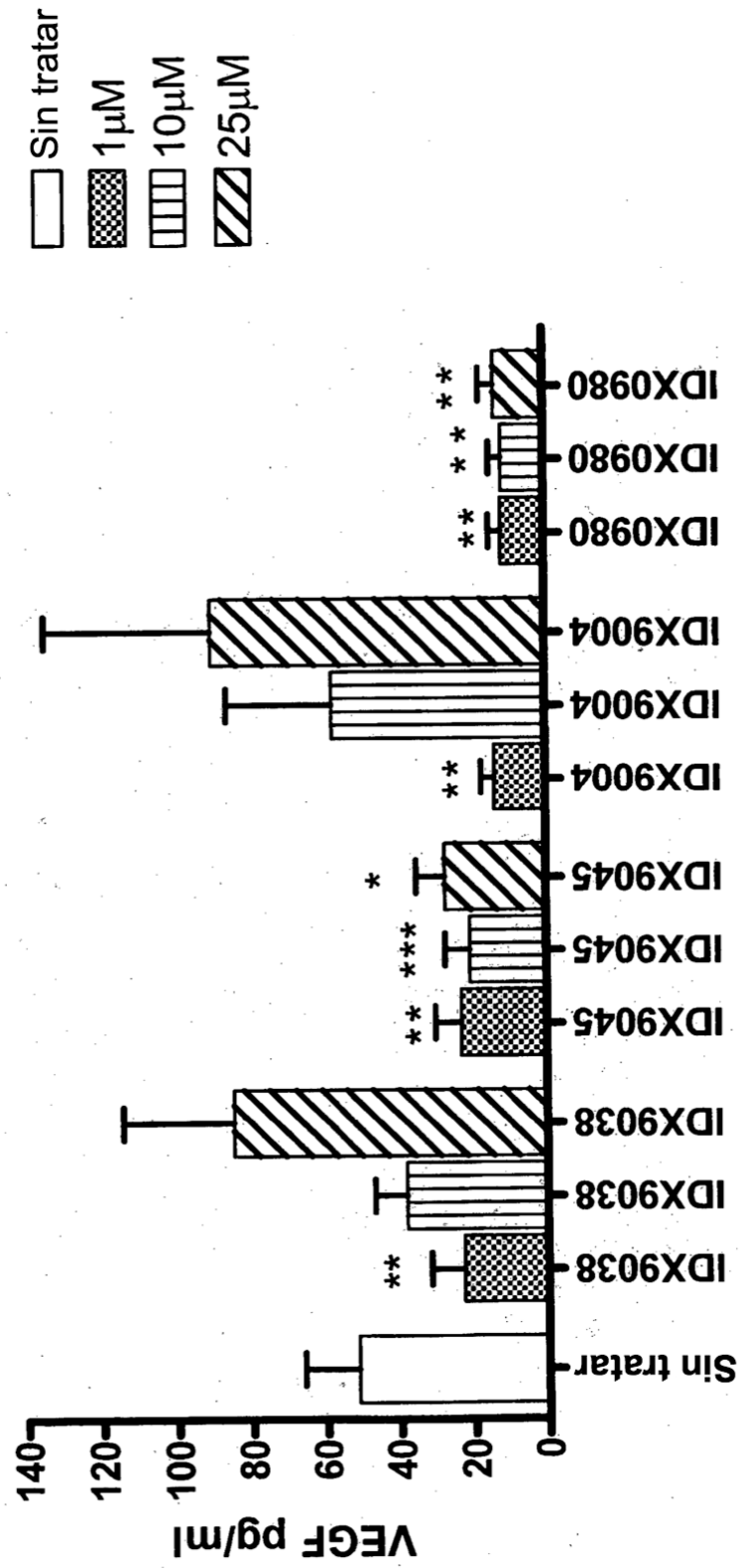


Fig. 17

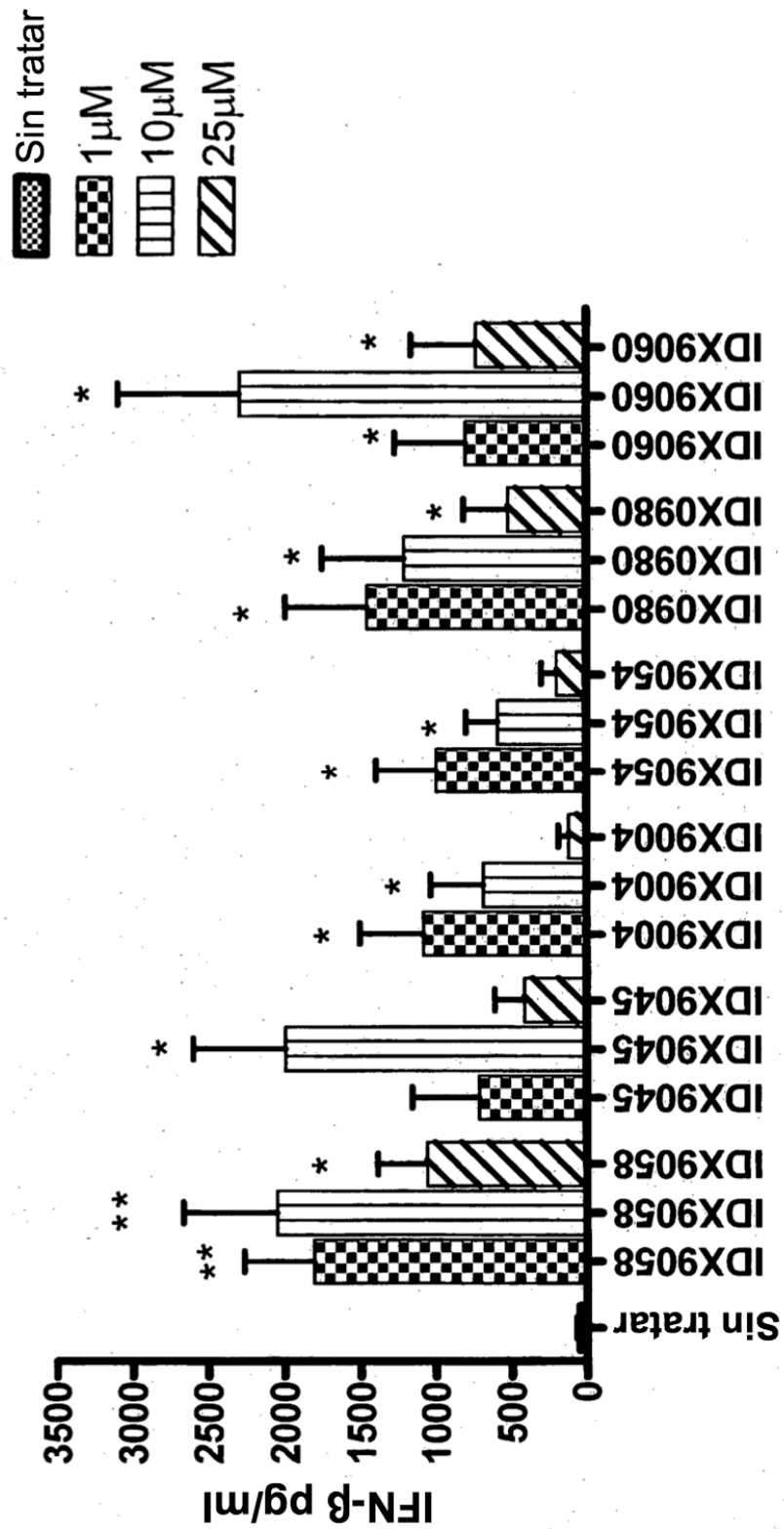


Fig. 18