

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 252**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2006 E 11161189 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2386298**

54 Título: **Tratamiento de afecciones intestinales**

30 Prioridad:

14.03.2005 GB 0505081

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

21.10.2016

73 Titular/es:

SYLENTIS S.A.U. (100.0%)

C/ José Abascal 2

28003 Madrid, ES

72 Inventor/es:

GASCÓN, IRENE;

JIMÉNÉZ, ANA I.;

JIMÉNÉZ, MARIA CONCEPCIÓN;

ROMÁN, JOSÉ P. y

SESTO, ANGELA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 587 252 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

Tratamiento de afecciones intestinales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de patologías intestinales por medio de la administración intrarrectal de la tecnología de ARNi y a los usos de tales composiciones. Las composiciones de la invención comprenden moléculas de ácido nucleico interferente pequeño (ANip) y compuestos relacionados que incluyen, pero sin limitación, ARN interferentes pequeños (ARNip). En particular, las composiciones de la invención se pueden utilizar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (EII), en particular de la enfermedad de Crohn. En determinadas realizaciones, las afecciones intestinales que provocan los niveles aumentados de interleucina 12 (IL-12), una citocina implicada en la respuesta inmunitaria de linfocitos T auxiliares de tipo 1 (Th1), se han de tratar mediante esta estrategia: por ejemplo las EII. Se proporcionan composiciones que comprenden ARNip y compuestos relacionados que actúan sobre la subunidad p40 de la IL12 y/o la subunidad p35 de la IL12, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con la sobreexpresión de la IL-12, en particular de la enfermedad de Crohn.

20 **Antecedentes de la invención**20 **La iARN como una herramienta para modular la expresión génica**

Interferencia por ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia mediado por ARN bicatenario (ARNbc). Después del descubrimiento del fenómeno en plantas en los primeros años de la década de los 90, Andy Fire y Craig Mello demostraron que el ARNbc inhibía de una manera extremadamente eficaz la expresión génica en *Caenorhabditis elegans*, de forma específica y selectiva (Fire *et al.*, 1998). La secuencia de la primera cadena (ARN *efector*) coincidía con la de la correspondiente región del ARN mensajero (ARNm) diana. La segunda cadena (ARN *antisentido*) era complementaria al ARNm. El ARNbc resultante resultó ser varios órdenes de magnitud más eficaz que las correspondientes moléculas de ARN monocatenarias (en particular, el ARN *antisentido*).

El proceso de la iARN comienza cuando la enzima DICER encuentra ARNbc y lo trocea en trozos denominados ARN interferente pequeño o ARNip. Esta proteína pertenece a la familia de la nucleasa ARNasa III. Un complejo de proteínas recoge estos ARNip y utiliza su código como una guía para buscar y destruir cualquier ARN en la célula con una secuencia de emparejamiento, tal como el ARNm diana (véase Boshier y Labouesse, 2000; y Akashi *et al.*, 2001).

En un intento por aplicar la iARN para la disminución de la expresión génica, se identificó que las células de mamífero han desarrollado diversos mecanismos de protección frente a las infecciones virales que podrían impedir el uso de esta estrategia. En efecto, la presencia de niveles extremadamente bajos de ARNbc viral desencadena una respuesta de interferón, dando como resultado una supresión global no específica de la traducción, lo que a su vez desencadena la apoptosis (Williams, 1997, Gil y Esteban, 2000).

En 2000, se describió que el ARNbc inhibe de manera específica tres genes en el ovocito y el embrión de ratón. La parada traduccional y, por lo tanto, una respuesta PKR, no se observó mientras los embriones continuaron desarrollándose (Wianny y Zernicka-Goetz, 2000). La investigación en Ribopharma AG (Kulmbach, Alemania) demostró la funcionalidad de la iARN en células de mamífero, utilizando ARNbc cortos (20-24 pares de bases), para inactivar genes en células de ser humano sin iniciar la respuesta de fase aguda. Experimentos similares que llevaron a cabo otros grupos de investigación confirmaron estos resultados (Elbashir *et al.*, 2001; Caplen *et al.*, 2001). Se determinó que los ARN horquillados cortos (ARNhc) analizados en diversas líneas celulares normales y de cáncer, de ser humano y ratón, pueden silenciar genes de forma tan eficaz como sus ARNip equivalentes (Paddison *et al.*, 2002). Recientemente, se demostró que otro grupo de ARN pequeños (21-25 pares de bases) media la regulación por disminución de la expresión génica. Estos ARN, ARN pequeños regulados temporalmente (ARNtp), regulan la temporización de la expresión génica durante el desarrollo en *Caenorhabditis elegans* (para una revisión véase Banerjee y Slack, 2002 y Grosshans y Slack, 2002).

Los científicos han utilizado iARN en varios sistemas, incluyendo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, tripanosomas y otros invertebrados. Recientemente, varios grupos han presentado la supresión específica de la biosíntesis de proteínas en distintas líneas celulares de mamífero (concretamente en células HeLa) demostrando que la iARN es un método ampliamente aplicable para el silenciamiento génico *in vitro*. A base de estos resultados, la iARN se ha vuelto rápidamente una herramienta bien reconocida para la validación (identificación y atribución) de funciones génicas. La iARN emplea oligonucleótidos de ARNbc cortos que proporcionarán una comprensión de la función de genes que están secuenciados solo de forma parcial.

Recientemente, Krützfeldt y colaboradores han demostrado que una clase de compuestos especialmente modificados por ingeniería genética denominados 'antagomires' pueden silenciar de forma eficaz la acción de

microARN (miARN), trozos no codificantes de ARN que regulan la expresión génica (Krützfeldt *et al.*, 2005).

La anterior es una discusión de la técnica relevante que concierne a la iARN. La discusión se proporciona solo para la comprensión de la invención como sigue, y no es una aceptación de que cualquiera de los trabajos descritos es técnica anterior para la invención reivindicada.

Interleucina 12 y enfermedad de Crohn.

La interleucina 12 (IL-12) es una glucoproteína heterodimérica de 70 kDa (IL12-p70) que consiste en una subunidad de 40 kDa (denominada IL12-p40) y una subunidad de 35 kDa (denominada IL12-p35) unidas por enlaces disulfuro que son esenciales para la actividad biológica de la IL-12. La IL-12 es una citocina clave que regula las respuestas inmunitarias mediadas por células y la reacción inflamatoria de los linfocitos T auxiliares de tipo 1 (Th1) (Gately *et al.*, 1998; Trinchieri, 1998). La capacidad de la IL-12 para promover con fuerza el desarrollo de los linfocitos Th1 la hace una diana ideal para el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos Th1, tal como las enfermedades autoinmunitarias y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Una EII particular es la enfermedad de Crohn, una patología caracterizada por una producción aumentada de IL-12 por células presentadoras de antígeno en el tejido intestinal, y de interferón γ y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por los linfocitos y macrófagos intestinales (Fais *et al.*, 1994; Fuss, *et al.*, 1996; Monteleone *et al.*, 1997; Parronchi *et al.*, 1997; Plevy *et al.*, 1997).

La enfermedad de Crohn provoca inflamación en el intestino delgado. La inflamación puede provocar dolor y puede hacer que los intestinos se vacíen con frecuencia, dando como resultado diarrea. Los síntomas más comunes de la enfermedad de Crohn son dolor abdominal y diarrea, aunque también puede producirse hemorragia rectal, pérdida de peso y fiebre. La hemorragia puede ser seria y persistente, conduciendo a anemia. Los niños con enfermedad de Crohn pueden padecer desarrollo retrasado y un crecimiento de menor tamaño.

La mayoría de las personas son tratadas primero con fármacos que contienen mesalamina, una sustancia que ayuda al control de la inflamación. La sulfasalazina es el más utilizado de estos fármacos. A los pacientes que no se benefician de esta o que no pueden tolerarla, pueden prescribirse otros fármacos que contienen mesalamina, conocidos en general como agentes 5-ASA, tal como Asacol, Dipentum o Pentasa. Los posibles efectos secundarios de las preparaciones de mesalamina incluyen náuseas, vómitos, diarrea y cefalea. Algunos pacientes toman corticosteroides para controlar la inflamación. Estos fármacos son los más eficaces para la enfermedad de Crohn activa, pero pueden provocar efectos secundarios serios, que incluyen mayor susceptibilidad a la infección. También se utilizan para tratar la enfermedad de Crohn fármacos que suprimen el sistema inmunitario. Los más comúnmente prescritos son la 6-mercaptopurina y un fármaco relacionado, la azatioprina. Los agentes inmunodepresores trabajan bloqueando la reacción inmunitaria que contribuye a la inflamación. Estos fármacos pueden provocar efectos secundarios como náuseas, vómitos y diarrea, y pueden reducir la resistencia de una persona a la infección. La cirugía para extirpar parte del intestino puede ayudar en la enfermedad de Crohn pero no puede curarla. Debido a los efectos secundarios y a la falta de eficacia de los tratamientos actuales para la enfermedad de Crohn, los investigadores continúan buscando tratamientos más eficaces.

La inhibición de la acción de la IL-12 ha demostrado suprimir el desarrollo y la evolución clínica de la enfermedad en una multitud de modelos experimentales de autoinmunidad e inflamación crónica (Caspi, 1998). Estos modelos incluyen la encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE), la uveítis autoinmunitaria experimental (UAE), la artritis inducida por colágeno (AIC), la nefritis autoinmunitaria, la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) y distintos modelos para la EII (Vandenbroeck *et al.*, 2004). En estos modelos, el papel de la IL-12 endógena se ha abordado utilizando ratones genosuprimidos para IL-12p40 o administrando anticuerpos anti IL-12.

En particular, actuar sobre IL-12 con anticuerpos es un tratamiento eficaz para la inflamación intestinal en modelos animales de la enfermedad de Crohn (Mannon *et al.*, 2004). Por lo tanto, los ratones con colitis inducida por sulfonato de trinitrobenceno tienen una inflamación del intestino mediada por Th1 caracterizada por una producción enormemente aumentada de IL-12, interferón γ y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). En ratones, la administración de un anticuerpo monoclonal frente a IL-12 puede dar como resultado la resolución de la colitis establecida y, si se proporciona en el momento de la inducción de la colitis, puede prevenir la inflamación (Neurath *et al.*, 1995).

El anticuerpo anti interleucina 12 también puede prevenir y tratar la colitis espontánea observada en modelos de inflamación mediada por Th1, tal como ratones que sobreexpresan el gen de CD3 ϵ de ser humano y ratones deficientes en interleucina 10 (Davidson *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 1998).

Los datos procedentes de un estudio de fase temprana 2 proporcionan algunas evidencias de que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal frente a la IL-12 p40 puede inducir la respuesta clínica y la remisión en pacientes con enfermedad de Crohn activa (Mannon *et al.*, 2004). Este tratamiento se asocia con descensos de las citocinas inflamatorias mediadas por Th1 en el sitio de la enfermedad.

La evidencia previa obtenida de modelos animales, así como los efectos clínicos del anti IL-12 en pacientes con enfermedad de Crohn (Mannon *et al.*, 2004), destaca la importancia de la IL-12 como una diana para futuros tratamientos para la enfermedad de Crohn.

5 Modulación de los niveles de IL-12 por medio de ARNip.

La dirección del ARNip a la expresión de la IL-12 ya se había utilizado para obtener células dendríticas (CD) modificadas que pudiesen utilizarse en diversos métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para modular la actividad de los linfocitos T y, por lo tanto, tiene uso en estrategias terapéuticas para el tratamiento de trastornos inmunitarios en un sujeto mamífero (documento WO 03/104456; Hill *et al.*, 2003). La dirección del ARNip a la IL-12 en CD maduras ha revelado un papel crítico de la IL-12 en la secreción de interferón γ (IFN- γ) de linfocitos citolíticos naturales promovida por CD maduras (Borg *et al.*, 2004). Adicionalmente, los inhibidores de IL-12 p35, incluyendo el ARNip, han demostrado sorprendentemente que bloquean la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos y la acumulación de triglicéridos en adipocitos (documento WO 03/104495).

El ARNip que va dirigido hacia IL-12 p40 se ha entregado de forma satisfactoria, por medio de encapsulado en liposomas, en la cavidad peritoneal murina para modular la respuesta inflamatoria local y sistémica después de la exposición a endotoxina (Flynn *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta donde se sabe, no hay evidencia previa de administración intrarrectal de ARNip para la regulación por disminución de la IL-12, ni de cualquier otro gen implicado en patologías intestinales. Los inventores han desarrollado técnicas para la regulación por disminución de la expresión de la IL-12 *in vivo* para tratar trastornos intestinales y también han desarrollado técnicas para la dirección de los ARNip al intestino mediante administración intrarrectal.

Flynn *et al.*; "Efficient delivery of small interfering RNA for inhibition of IL-12p40 expression in vivo", Journal of Inflammation; Vol. 1; (2004) divulgan la dirección a la IL-12 p40 *in vitro* utilizando ARNip.

Neurath *et al.*; "Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice"; Journal of experimental medicine; Vol. 182, (1995), divulgan el uso de anticuerpos anti IL-12 para anular en ratones la colitis experimental establecida. Monteleone *et al.*; "Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells"; Gastroenterology; Vol. 112 (1997), divulgan un anticuerpo que va dirigido hacia IL-12 *in vitro*.

Vandenbroeck *et al.*; "Inhibiting cytokines of the interleukin-12 family: recent advances and novel challenges"; Journal of Pharmacy and Pharmacology; Vol. 56 (2004), es una revisión que divulga la inhibición de la señalización de la IL-12 por fármacos de molécula pequeña. El documento WO2004/091572 describe composiciones de ARNip nuevas que contienen cocleatos y sugiere que estos pueden utilizarse para tratar una serie de trastornos.

35 Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de un ácido nucleico interferente pequeño (ANip) que provoca la interferencia por ARN de la interleucina 12 (IL-12), en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en el que el ANip se administra a un paciente por vía intrarrectal y dicha interferencia por ARN se produce en el tejido intestinal pero no en el tejido de vejiga, riñón, pulmón, ovario o hígado.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que comprende un ácido nucleico interferente pequeño (ANip) que provoca la interferencia por ARN de la interleucina 12 (IL-12), en el que dicha composición se formula para la administración intrarrectal, y en el que la interferencia por ARN se produce en el tejido intestinal pero no en el tejido de vejiga, riñón, pulmón, ovario o hígado.

La presente divulgación proporciona composiciones para su uso para el tratamiento de patologías intestinales por medio de la administración intrarrectal de la tecnología de la iARN. Las composiciones de la divulgación comprenden moléculas de ácido nucleico interferentes pequeñas (ANip) y compuestos relacionados que incluyen, pero sin limitación, ARNip. En particular, las composiciones de la divulgación se pueden utilizar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de patologías intestinales que incluyen: enfermedades hiperproliferativas, en particular cáncer colorrectal; enfermedades autoinmunitarias e intestinales inflamatorias (EII), en particular la enfermedad de Crohn; colitis, en particular la colitis ulcerosa; síndrome del intestino irritable; enfermedades infecciosas del intestino, tal como colitis pseudomembranosa, amebosis o tuberculosis intestinal; pólipos del colon; enfermedad diverticular; estreñimiento; oclusión intestinal; síndromes de malabsorción; enfermedades del recto y diarrea. En una realización preferente, el uso de la presente invención puede ser la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Crohn. La presente divulgación abarca el uso de ANip que incluye, pero sin limitación, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc) y ARN horquillado corto (ARNhc), que tienen la capacidad de mediar la interferencia por ARN. La presente divulgación abarca el uso de ANip que incluye pero sin limitación, moléculas de antagomires y de microARN (miARN) que tienen la capacidad de mediar la interferencia por ARN.

Los usos de la divulgación comprenden la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de uno o más ANip de la invención, para el tratamiento de una afección intestinal. En realizaciones preferentes, los métodos de la divulgación comprenden la administración intrarrectal del ANip terapéutico.

En una realización, la presente divulgación se refiere a ANip o entidades sintetizadas de forma química similares, que están dirigidas a interferir la expresión de ARNm ya sea de la subunidad p35 o de la subunidad p40 de la citocina IL-12, y que en última instancia modula la cantidad de proteína producida. Las composiciones y usos que comprenden el ARNip mencionado anteriormente y los compuestos relacionados están destinados al tratamiento de enfermedades asociadas con la sobreexpresión de la IL-12, tales como enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias intestinales (EII), en particular de la enfermedad de Crohn.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Secuencias de oligonucleótido para las moléculas de ARNip que actúan sobre las subunidades IL-12 p35 y p40 que abarca la presente invención. Los N.º de SEQ ID proporcionados en la Figura se refieren a la cadena codificante (5' → 3'); normalmente el ARNip se administrará como ARNbc, así que incluirá la cadena codificante y su complemento.

Figura 2. Efecto del ARNip sobre la expresión de la subunidad IL-12 p35 en un sistema *in vitro*. El tratamiento con ARNip reduce los niveles del transcrito del gen de IL-12 p35. Se preparó ARN procedente de células SW480 tratadas con los ARNip para distintos tiempos. Las muestras se analizaron mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos. Los valores muestran los niveles de expresión medios de distintos transcritos normalizados con 18S como gen constitutivo.

Figura 3. Efecto del ARNip sobre la expresión de la subunidad IL-12 p40 en un sistema *in vitro*. **A:** el tratamiento con ARNip reduce los niveles del transcrito del gen de IL-12 p40 en células de ser humano. Se preparó ARN procedente de células SW480 tratadas con ARNip de SEQ ID 67 y SEQ ID 79 a distintos tiempos, a la dosis de tratamiento de 200 nM. Los valores muestran los niveles de expresión medios de distintos transcritos normalizados con 18S como gen constitutivo. Los valores representan la media del porcentaje de los niveles normalizados de ARNm después de la interferencia por ARNip sobre el control de la expresión génica y sus desviaciones estándar medias (DEM). **B:** el tratamiento con ARNip reduce los niveles del transcrito del gen de IL-12 p40 en células murinas. Se preparó ARN de células C2C12 tratadas con ARNip de SEQ ID 86 y SEQ ID 87 a distintos tiempos, a la dosis de tratamiento de 100 nM. SEQ ID 86, que es el homólogo de SEQ ID 67 de ser humano, va dirigido hacia la subunidad IL-12 p40 de ratón. Además de actuar sobre la subunidad IL-12 p40 de ratón, SEC ID 87 es el ARNip con la mejor puntuación en ratón, y no tiene dúplex de ARNip homólogo en ser humano. Las moléculas de ANip de SEQ ID 86 y SEQ ID 87 son como se describe a continuación, con protuberancias 3' de 2 nucleótidos timidina. Los valores representan la media del porcentaje de los niveles normalizados de ARNm comparados con 18S tras la interferencia por ARNip sobre el control de la expresión génica y sus desviaciones estándar medias (DEM).

Figura 4. El tratamiento con ARNip reduce los niveles del transcrito del gen de la GFP en el intestino delgado. Los tejidos recogidos en OCT se analizaron mediante microscopía y se midieron mediante el programa informático Photoshop. Los datos muestran el tratamiento con ARNip de dosis única (ratones 2-3) y el tratamiento de dosis repetidas (ratones 4-5). Los valores muestran los niveles de expresión de 25 imágenes representativas por ratón, con referencia al ratón no tratado de control. Se representa la desviación estándar de los datos.

Figura 5. El tratamiento con ARNip reduce los niveles del transcrito del gen de la GFP en el intestino delgado. El tejido recogido en RNA later se analizó por RT-PCR. Los datos muestran el tratamiento con ARNip de dosis única (ratones 2-3) y el tratamiento de dosis repetidas (ratones 4-5). Se representa la desviación estándar.

Figura 6. Tratamiento con ARNip reduce los niveles del transcrito del gen de la GFP en el intestino grueso. El tejido recogido en OCT se analizó mediante microscopía y se midió mediante el programa informático Photoshop. Los datos muestran el tratamiento con ARNip de dosis única (ratones 2-3) y el tratamiento de dosis repetida (ratones 4-5). Los valores muestran los niveles de expresión de 25 imágenes representativas por ratón, con referencia al ratón no tratado de control. Se representa la desviación estándar de los datos.

Figura 7: El tratamiento con ARNip reduce los niveles del transcrito del gen de la GFP en el intestino grueso. El tejido recogido en RNA later se analizó por RT-PCR. Los datos muestran el tratamiento con ARNip de dosis única (ratones 2-3) y el tratamiento de dosis repetidas (ratones 4-5). Se representa la desviación estándar.

Figura 8: Datos de las muestras recogidas en medio OCT.

Figura 9: Datos de las muestras recogidas en RNA later.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento de patologías intestinales por medio de la administración intrarrectal de la tecnología de la iARN y el uso de tales composiciones. Las composiciones de la invención comprenden moléculas de ácido nucleico interferentes pequeñas (ANip) que modulan la expresión de

genes diana asociados con afecciones de la pared intestinal.

Los métodos de la divulgación comprenden la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de uno o más ANip de la invención.

5

Diseño del ARNip

Un gen es "diana" de ANip de acuerdo con la invención cuando, por ejemplo, el ANip disminuye o inhibe de forma selectiva la expresión del gen. Como alternativa, el ANip va dirigido hacia un gen cuando el ANip hibrida en condiciones rigurosas con el transcrito del gen. La capacidad del ANip para actuar sobre un gen puede analizarse ya sea *in vitro* o *in vivo*.

10

En 1999, Tuschl *et al.* descifraron el efecto de silenciamiento de los ARNip, mostrando que su eficacia está en función de la longitud del dúplex, la longitud de las protuberancias del extremo 3' y la secuencia de estas protuberancias.

15

La selección de la región homóloga correcta dentro del gen diana es de gran importancia para el silenciamiento preciso. Como secuencia del ANip de la invención, se elige un fragmento corto de la secuencia del gen diana (por ejemplo, 19-40 nucleótidos de longitud). En una realización, el ANip es ARNip. En tales realizaciones, el fragmento corto de la secuencia del gen diana es un fragmento del ARNm del gen diana. En realizaciones preferentes, los criterios para la elección de un fragmento de secuencia procedente de ARNm del gen diana para ser una molécula de ARNip candidata incluyen: 1) una secuencia procedente del ARNm del gen diana que es por lo menos de 50 a 100 nucleótidos desde el extremo 5' o 3' de la molécula de ARNm nativa; 2) una secuencia procedente del ARNm del gen diana que tiene un contenido de G/C de entre el 30 % y el 70 %, muy preferentemente alrededor del 50 %; 3) una secuencia procedente del ARNm del gen diana que no contiene secuencias repetitivas (por ejemplo, AAA, CCC, GGG, TTT, AAAA, CCCC, GGGG, TTTT); 4) una secuencia procedente del ARNm del gen diana que es accesible en el ARNm; y 5) una secuencia procedente del ARNm del gen diana que es exclusiva para el gen diana. El fragmento de secuencia procedente del ARNm del gen diana puede satisfacer uno o más de los criterios identificados anteriormente mencionados. En realizaciones preferentes de la divulgación, el ARNip tiene un contenido de G/C por debajo del 60 % y/o carece de secuencias repetitivas.

20

25

30

De un modo práctico, el gen de interés se introduce como una secuencia de nucleótidos en un programa de predicción que tenga en cuenta todas las variables descritas anteriormente para el diseño de oligonucleótidos óptimos. Este programa explora cualquier secuencia de nucleótidos de ARNm para regiones susceptibles de ser diana del ARNip. El resultado de este análisis es una puntuación de posibles oligonucleótidos ARNip. Las puntuaciones más altas se utilizan para diseñar oligonucleótidos de ARN bicatenarios (normalmente de un largo de 21 pb, aunque también son posibles otras longitudes) que normalmente se preparan mediante síntesis química. Los inventores tienen la intención de analizar varias modificaciones químicas que son bien conocidas en la técnica. Estas modificaciones apuntan a aumentar la estabilidad o la disponibilidad de los oligonucleótidos de ARNbc.

35

40

Adicionalmente, los oligonucleótidos candidatos pueden filtrarse para la conservación interespecie de secuencias para facilitar la transición de los estudios clínicos en animales a los estudios clínicos en el ser humano.

Además del ANip, que es perfectamente complementario con la región diana, se pueden utilizar secuencias de ANip degeneradas para actuar sobre regiones homólogas. El documento WO2005/045037 describe el diseño de moléculas de ANip para actuar sobre a tales secuencias homólogas, por ejemplo incorporando pares de bases no canónicas, por ejemplo faltas de coincidencia y/o pares de bases oscilantes, que puedan proporcionar secuencias diana adicionales. En los casos en donde las faltas de coincidencia estén identificadas se pueden utilizar pares de bases no canónicas (por ejemplo, faltas de coincidencia y/o bases oscilantes) para generar moléculas de ANip que actúen sobre más de una secuencia génica. En un ejemplo no limitante, las pares de bases no canónicas tales como los pares de bases UU y CC se utilizan para generar moléculas de ANip que tienen la capacidad de actuar sobre secuencias para dianas diferentes que comparten homología de secuencia. Como tal, una ventaja del uso de los ANip de la invención es que puede diseñarse un único ANip para incluir una secuencia de ácido nucleico que sea complementaria con la secuencia de nucleótidos que está conservada entre genes homólogos. En esta estrategia, se puede utilizar un único ANip para inhibir la expresión de más de un gen en lugar de utilizar más de una molécula de ANip para actuar sobre genes distintos.

45

50

55

La identidad de secuencia se puede calcular por comparación de secuencias y algoritmos de alineamiento conocidos en la técnica (véase Gribskov y Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, y referencias citadas allí) y por el cálculo de la diferencia porcentual entre las secuencias de nucleótidos mediante, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman como se implementa en el programa informático BESTFIT, utilizando parámetros predeterminados (por ejemplo, University of Wisconsin Genetic Computing Group). Es preferente una identidad de secuencia mayor que el 90 %, 95 % o 99 % entre el ANip y la parte del gen diana. Como alternativa, la complementariedad entre el ANip y la molécula de ARN nativa se puede definir funcionalmente por hibridación así como funcionalmente por su capacidad para disminuir o inhibir la expresión de un gen diana. La capacidad de un ANip para afectar la expresión génica se puede determinar de forma empírica ya sea *in vivo* o *in vitro*.

60

65

Las moléculas de ANip preferentes de la invención son bicatenarias. En una realización de la divulgación, las moléculas de ANip bicatenarias comprenden extremos romos. En otra realización de la invención, las moléculas de ANip bicatenarias comprenden nucleótidos protuberantes (por ejemplo, protuberancias de 1-5 nucleótidos, preferentemente protuberancias de 2 nucleótidos). En una realización específica, los nucleótidos protuberantes son protuberancias 3'. En otra realización específica de la divulgación, los nucleótidos protuberantes son protuberancias 5'. Cualquier tipo de nucleótido puede ser parte del extremo protuberante. En una realización de la divulgación, el nucleótido o nucleótidos protuberantes son ácidos ribonucleicos. En otra realización, el nucleótido o nucleótidos protuberantes son ácidos desoxirribonucleicos. En una realización preferente de la invención, el nucleótido o nucleótidos protuberantes son nucleótidos de timidina. En otra realización de la divulgación, el nucleótido o nucleótidos protuberantes son nucleótidos modificados o no clásicos. El nucleótido o nucleótidos protuberantes pueden tener enlaces internucleótidos no clásicos (por ejemplo, que no sean enlaces fosfodiéster).

Síntesis de dúplex de ANip.

15 El ANip se puede sintetizar mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente, los ARN se sintetizan de forma química utilizando ribonucleósidos fosforamidita protegidos de forma apropiada y un sintetizador de ADN/ARN convencional. De forma adicional, el ANip se puede obtener de proveedores comerciales de síntesis de oligonucleótidos de ARN que incluyen, pero sin limitación, Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE. UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE. UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE. UU.), y Cruachem (Glasgow, RU), Qiagen (Alemania) Ambion (EE. UU.) e Invitrogen (Escocia). De forma alternativa, las moléculas de ANip de la invención se pueden expresar en células transfectando las células con vectores que contienen la secuencia complemento inversa del ANip bajo el control de un promotor. Una vez expresado, el ANip se puede aislar de la célula usando técnicas bien conocidas en la técnica.

20

25 Es necesaria una etapa de apareamiento cuando se trabaja con moléculas de ARN monocatenarias. Para aparear los ARN se deben combinar 30 µl de cada solución de oligonucleótido de ARN 50 µM en acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM. Después, la solución se incuba durante un minuto a 90 °C, se centrifuga durante 15 segundos y se incuba durante 1 hora a 37 °C.

30 En realizaciones de la divulgación en donde el ANip es un ARN horquillado corto (ARNhc), las dos cadenas de la molécula de ANip se pueden estar conectadas mediante una región enlazadora (por ejemplo, un enlazador de nucleótidos o un enlazador que no sea de nucleótidos).

Modificación química del ANip.

35 Los ANip de la divulgación pueden contener uno o más nucleótidos modificados y/o uniones no fosfodiéster. Las modificaciones químicas bien conocidas en la técnica tienen la capacidad de aumentar la estabilidad, disponibilidad y/o la captación celular del ANip. El experto en la materia conocerá otros tipos de modificación química que pueda incorporarse en las moléculas de ARN (véanse las Publicaciones Internacionales WO03/070744 y WO2005/045037 para una visión de conjunto de los tipos de modificaciones).

40

En una realización, las modificaciones se pueden utilizar para proporcionar resistencia mejorada a la degradación o captación mejorada. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen uniones internucleótidos de fosforotioato, 2'-O-metil ribonucleótidos (en especial en la cadena codificante de un ANip bicatenario), 2'-deoxi-fluoro ribonucleótidos, 2'-deoxi ribonucleótidos, nucleótidos "de base universal" 5-C-metil nucleótidos e incorporación de restos deoxibásicos invertidos (véase en general el documento GB2406568).

45

En otra realización, las modificaciones se pueden utilizar para potenciar la estabilidad de los ANip o para aumentar la eficacia de la dirección. Las modificaciones incluyen entrecruzamiento químico entre las dos cadenas complementarias de un ANip, modificación química de un extremo 3' o 5' de una cadena de un ANip, modificaciones del azúcar, modificaciones de nucleobase y/o modificaciones de la estructura, ribonucleótidos modificados por 2'-fluor y 2'-dioxi ribonucleótidos (véase en general la Publicación Internacional WO2004/029212).

50

En otra realización, las modificaciones se pueden utilizar para aumentar o disminuir la afinidad por los nucleótidos complementarios en el ARNm diana y/o en la cadena de ANip complementaria (véase en general la Publicación Internacional WO2005/044976). Por ejemplo, un nucleótido pirimidina no modificado puede sustituirse por una 2-tio, 5-alquilil, 5-metil o 5-propinil pirimidina. De forma adicional, una purina no modificada se puede sustituir con una 7-deaza, 7-alquil o 7-alquenil purina.

55

En otra realización, cuando el ANip es un ANip bicatenario, los nucleótidos protuberantes 3'-terminales se reemplazan por desoxirribonucleótidos (véase en general Elbashir *et al.*, 2001).

60

Análisis de los dúplex de ANip *in vitro*.

65 Para comprobar la especificidad de la interferencia por ANip se emplearon cultivos celulares que expresan los genes diana.

En el caso de las subunidades IL-12 p35 y p40, las células utilizadas para los experimentos fueron células SW480 de ser humano y células de músculo murinas C2C12. Después de la incubación de las células con los correspondientes dúplex de ARNip, se analizaron los niveles de expresión de p35 y de p40. Para vincular la disminución de la expresión por ARNip con los fenotipos específicos en las células en cultivo, es necesario demostrar la disminución de la proteína diana o por lo menos demostrar la reducción del ARNm diana.

Los niveles de ARNm del gen diana se pueden cuantificar mediante PCR en tiempo real (RT-PCR). Adicionalmente, los niveles de proteína se pueden determinar en diversos modos bien conocidos en la técnica, tales como análisis por transferencia de Western con anticuerpos específicos para las distintas dianas, que permite el control directo de la reducción de la proteína diana.

Los ARNip se introducen en las células por medio de cualquier técnica de transfección bien conocida en la técnica. Se puede realizar una única transfección de dúplex de ARNip, por ejemplo, utilizando un lípido catiónico, tal como el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen), seguido 24, 48 y 72 horas después de la transfección de un ensayo de eficacia de silenciamiento.

Un protocolo típico de transfección se puede realizar como sigue: para un pocillo de una placa de 6 pocillos, los inventores transfectan utilizando como concentración final, ARNip 100 nM para las células C2C12 murinas o 200 nM para las células SW480 de ser humano. Siguiendo el protocolo del reactivo Lipofectamina 2000, el día antes de la transfección, los inventores siembran $2-4 \times 10^5$ células por pocillo en 3ml de un medio de cultivo apropiado, que contiene DMEM, suero al 10%, antibióticos y glutamina, e incuban las células en condiciones de cultivo normales (37 °C y CO₂ al 5%). El día de la transfección, las células tienen que estar en una confluencia del 30-50%. Los inventores diluyen 12,5 µl de dúplex de ARNip 20 µM (que corresponde a una concentración final de 100 nM) o 25 µl de dúplex de ARNip 20 µM (que corresponde a una concentración final de 200 nM) en 250 µl de DMEM, y mezclan. También, se diluyen 6 µl de Lipofectamina 2000 en 250 µl de DMEM y se mezcla. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, el oligómero diluido (dúplex de ARNip) y la Lipofectamina diluida se combinan para permitir la formación del complejo durante unos 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. Más tarde los inventores añaden los complejos gota a gota sobre las células con 2 ml de medio de cultivo recién preparado bajo en antibióticos y mezclan suavemente, balanceando la placa hacia un lado y al otro, para asegurar la distribución uniforme de los complejos de transfección. Los inventores incuban las células en sus condiciones de cultivo normales y el día posterior los complejos se retiran y se añade medio de cultivo completo recién preparado. Para controlar el silenciamiento génico, las células se recogen a las 24, 48 y 72 post infección.

La eficacia de transfección puede depender del tipo celular, pero también del número de pases y de la confluencia de las células. El tiempo y la manera de formación de los complejos ARNip-liposoma (por ejemplo, inversión frente a agitación vorticial) también son críticos. Las bajas eficacias de transfección son la causa más frecuente de un silenciamiento no satisfactorio. Una buena transfección no es un asunto trivial y necesita examinarse cuidadosamente para cada línea celular nueva a utilizar. La eficacia de transfección se puede analizar transfectando genes indicadores, por ejemplo, un plásmido de expresión de EGFP dirigido por CMV (por ejemplo, de Clontech) o un plásmido de expresión de B-Gal, y después se puede evaluar el día siguiente por microscopía de contraste de fase y/o de fluorescencia.

Dependiendo de la abundancia y del tiempo de vida (o de renovación) de la proteína diana, un fenotipo de reducción de la expresión puede hacerse evidente después de 1 a 3 días, o incluso más tarde. En los casos en donde no se observa fenotipo, se puede observar el empobrecimiento de la proteína mediante inmunofluorescencia o transferencia de Western.

Después de las transfecciones, se pretratan con ADNasa I las fracciones de ARN total extraídas de las células y se utiliza para transcripción inversa utilizando un cebador aleatorio. Como control para la amplificación de los pre-ARNm, se utiliza amplificación por PCR con un par de cebadores específicos que cubran por lo menos un punto de unión exón-exón. También se necesita como control la RT-PCR de un ARNm que no sea diana. El empobrecimiento eficaz del ARNm a pesar de la reducción no detectable de la proteína diana, puede indicar que podría existir en la célula un gran depósito de proteína estable. Como alternativa, puede utilizarse amplificación por RT-PCR para analizar de un modo más preciso la disminución o la desaparición de ARNm. La RT-PCR cuantifica la cantidad inicial del molde de forma más específica, más sensible y más reproducible. En un aparato termociclador con detección de fluorescencia la RT-PCR controla la fluorescencia emitida durante la reacción como un indicador de la producción de amplión durante cada ciclo de PCR. Esta señal aumenta de forma directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR en una reacción. Registrando la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible controlar la reacción de PCR durante la fase exponencial, en donde el primer aumento significativo de la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de templado diana.

Se realizó RT-PCR cuantitativa para verificar en los cultivos celulares el patrón de interferencia de los genes de IL-p35 y p40 expresados de forma diferencial. Para la RT-PCR cuantitativa se utilizaron para la transcripción inversa aproximadamente 500 ng de ARN total, seguido de amplificación por PCR con cebadores específicos para cada gen en la reacción. Las condiciones de PCR fueron una etapa inicial de 30 s a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 5 s a 95 °C, 10 s a 62 °C y 15 s a 72 °C. La cuantificación del ARNm de 18S se utilizó como un gen constitutivo, como

control para la normalización de los datos. Las comparaciones de la expresión génica relativa funcionan mejor cuando la expresión génica del control endógeno/interno elegido es más abundante y permanece constante, en proporción al ARN total, entre las muestras. Utilizando un control endógeno invariable como una referencia activa, la cuantificación de un ARNm diana se puede normalizar para las diferencias en la cantidad de ARN total añadida a cada reacción. Las curvas de amplificación obtenidas con el termociclador con detección de fluorescencia se analizaron en combinación con el ADN de control del kit, que va dirigido hacia el molde de ADN de la beta-globina transcrito *in vitro*, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para evaluar la especificidad del producto de PCR amplificado se realizó un análisis de curva de fusión. Las curvas de fusión resultantes permiten la discriminación entre los dímeros de cebadores y el producto de PCR específico.

Administración intrarrectal de ANip.

Los estudios de entrega intrarrectal de ANip se llevaron a cabo en ratones GFP C57BL/6-TG (ACTB-EGFP). Esta línea de ratón transgénico se compró a "The Jackson Laboratory". Los ratones transgénicos se han utilizado debido a que los ratones homocigóticos para este transgén mueren dentro de las primeras dos semanas después del nacimiento. La línea de ratón transgénico con un ADNc de la GFP "potenciada" (EGFP: sigla del inglés *enhanced GFP*) bajo el control de un promotor de la beta-actina de gallina y del potenciador de citomegalovirus, hace que todos los tejidos, con excepción de los eritrocitos y el pelo, se presenten verdes bajo luz de excitación. Esta cepa se generó en ratones C57BL/6. El ADNc de la cepa que codifica la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) se anexó al promotor de la beta actina de gallina y al potenciador de citomegalovirus. También se incluyó en la construcción una señal de poliadenilación de la globina bovina. Se utilizaron los sitios EcoRI incluidos en los cebadores de PCR para introducir el ADNc de EGFP amplificado en el vector de expresión pCAGGS que contiene el promotor de la beta-actina de gallina y el potenciador de citomegalovirus, el intrón de la beta-actina y la señal de poliadenilación de la globina bovina. El inserto completo con el promotor y la secuencia codificante se retiró con Bam-HI y Sall y se purificó mediante gel.

El dúplex de ARNip utilizado para la inyección intrarrectal en ratones se compró en Dharmacon. Dharmacon Research Inc (Lafayette, CO) ha desarrollado una nueva generación de ARNip modificado para el uso *in vivo* como un producto terapéutico, denominado siSTABLEv2. El ARNip siSTABLEv2 de Dharmacon ha demostrado una estabilidad en suero potenciada con respecto con la del ARNip no modificado. Normalmente, el ARNip convencional se degrada al cabo de minutos en entornos que contienen suero, haciendo problemático el uso *in vivo* del ARNip. La modificación de siSTABLEv2 amplía de forma drástica la estabilidad del ARNip en suero, como se describe en la página de internet de Dharmacon's (<http://www.dharmacon.com/docs/siSTABLE%20v2%20Flier.pdf>).

El ARNip utilizado para regular por disminución la expresión del ARNm de EGFP va dirigido hacia la siguiente secuencia en el ARNm de EGFP: 5'-GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC-3' (SEQ ID N.º 88). La cadena codificante del dúplex de ARNip fue 5'-P GGC UAC GUC CAG CGC ACC-3' (SEQ ID N.º 89) y la cadena no codificante fue 5'-P U GCG CUC CUG GAC GUA GCC UU-3' (SEQ ID N.º 90). Dharmacon distribuye esta secuencia como dúplex presintetizado de control de ARNip de proteína verde fluorescente.

Para los experimentos de entrega intrarrectal se utilizaron ratones C57BL/6-TG (ACTB-EGFP) (machos, de 8 semanas de edad). Los animales se mantuvieron con alimento y agua a demanda hasta un día antes del protocolo experimental. Para el silenciamiento terapéutico intrarrectal los ratones se mantuvieron en ayunas durante un día antes del tratamiento. Normalmente, los fármacos se administran mediante la inyección de un volumen pequeño (120 µl) en el recto. El ratón de control se trata solo con vehículo. En todos los casos los animales se sacrificaron dos días después de la primera inyección mediante dislocación cervical. El protocolo para la aplicación de ARNip en ratón es como sigue. Para cada administración experimental, se premezclaron 60 µl de dúplex de ARNip con 60 µl de NaCl (1,8 % p/v) hasta niveles fisiológicos. En todos los casos los animales se sacrificaron dos días después de la primera inyección.

Las condiciones experimentales utilizadas se indican en la Tabla a continuación. Cada condición se analizó por duplicado. Los ratones 2 y 3 se trataron por vía intrarrectal con una dosis de 250 µg (19 nanomoles) de ARNip contra GFP, mientras que los ratones 4 y 5 se trataron con dos dosis de 125 µg de ARNip durante dos días consecutivos.

Tabla: Distribución esquemática de las condiciones experimentales para la entrega intrarrectal de ARNip. Las dosis de ARNip se indican en la tabla.

Número de ratón	Tratamiento intrarrectal terapéutico
1	Dosis de vehículo de control
2	Dosis única de 250 µg de ARNip
3	Dosis única de 250 µg de ARNip
4	Dos dosis de 125 µg de ARNip cada 24 h
5	Dos dosis de 125 µg de ARNip cada 24 h

Los tejidos de muestra se recogieron y analizaron mediante dos métodos: uno en medio OCT y otro en RNA later (Ambion). Los bloques de OCT se almacenaron a -80 °C hasta el procesamiento de los datos. Los bloques de OCT se cortaron en cortes de 12 µm con un criostato (Leica CM 1850) a -20 °C. Los cortes recogidos se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) acoplado a una cámara digital (DP70), utilizando un filtro de 480 nm. Las condiciones de sensibilidad (ISO200), la resolución de tamaño de imagen (2040x1536) y el tiempo de exposición (1 segundo) se establecieron para todas las muestras para compararlas entre ellas. La fluorescencia verde se midió como un índice de expresión de GFP mediante el programa informático Adobe Photoshop (versión 8.0). Mediante este método, se recogieron 25 datos distintos para cada tejido analizado. Los tejidos aislados en RNA later se almacenaron a -20 °C. El RNA later se retiró antes de la extracción de ARN. El ARN se aisló con el reactivo Trizol (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El tratamiento con ADNasa se realizó antes de la medición de la expresión de GFP mediante RT-PCR, como se describe anteriormente.

Formulaciones farmacéuticas y vías de administración.

La presente divulgación puede comprender la administración de una o más especies de molécula de ANip de forma simultánea. Estas especies se pueden seleccionar para actuar sobre uno o más genes diana.

En una realización, en los métodos terapéuticos de la divulgación se administra un único tipo de ANip. En otra realización, el ANip de la invención se administra en combinación con otro ANip de la invención y/o con uno o más de otros agentes terapéuticos que no son ANip útiles en el tratamiento, prevención o atención de una enfermedad de la pared intestinal. La expresión "en combinación con" no se limita a la administración de agentes terapéuticos exactamente en el mismo momento, sino que más bien quiere decir que los ANip de la invención y el otro agente se administran a un paciente en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma tal que el beneficio de la combinación es mayor que el beneficio si se administraran de otra forma. Por ejemplo, cada agente terapéutico se puede administrar en el mismo momento o de forma secuencial en cualquier orden en distintos momentos; sin embargo, si no se administran en el mismo momento, deberían administrarse suficientemente cercanos en el tiempo a fin de proporcionar el efecto terapéutico deseado. Cada agente terapéutico se puede administrar de forma separada, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada.

Los ARNip de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas por cualquier técnica convencional conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Alfonso, G. *et al.*, 1995, en: *The Science and Practice of Pharmacy*, Mack Publishing, Easton PA, 19ª ed.). Las formulaciones que comprenden uno o más ARNip para su uso en la invención pueden estar en numerosas formas y pueden depender de diversos factores específicos para cada paciente (por ejemplo, el tipo y gravedad del trastorno, tipo de ANip administrado, edad, peso corporal, respuesta y el historial médico del paciente), el número y tipo de los ANip en la formulación, la forma de la composición (por ejemplo, en forma líquida, semilíquida o sólida) la pauta terapéutica (por ejemplo, si el agente terapéutico se administra a lo largo del tiempo como una infusión lenta, un bolo único, una vez al día, varias veces al día o una vez cada varios días) y/o la ruta de administración (por ejemplo, por medio tópico, oral, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, transdérmico, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, entérico o sublingual).

Las moléculas de ANip de la invención y las formulaciones o composiciones de las mismas se pueden administrar de forma directa o por vía tópica como se conoce en general en la técnica. Por ejemplo, una molécula de ANip puede comprender un vehículo de entrega, incluyendo liposomas, para la administración a un sujeto. Pueden estar presentes en las formulaciones farmacéuticamente aceptables transportadores y diluyentes, y sus sales. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar a las células mediante diversos métodos conocidos para los expertos en la materia, que incluyen, pero sin restricción, encapsulado en liposomas, por iontoforesis o por incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas-ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) y microesferas de PLGA, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos. En otra realización de la divulgación, las moléculas de ácido nucleico de la invención también puedan formularse o formar complejo con polietilenimina o derivados de la misma, tales como los derivados polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL).

Una molécula de ANip de la invención puede formar complejo con agentes de ruptura de la membrana y/o un lípido catiónico o molécula lipídica auxiliar.

Los sistemas de entrega que pueden utilizarse con la invención incluyen, por ejemplo, geles acuosos o no acuosos, cremas, múltiples emulsiones, microemulsiones, liposomas, pomadas, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases de hidrocarburos y polvos, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de la penetración (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos) y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbofil y polivinilpirrolidona). En una realización, el transportador farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.

Una formulación farmacéutica de la invención está en una forma adecuada para la administración, por ejemplo, administración sistémica o local, en una célula o sujeto, incluyendo, por ejemplo, a un ser humano. Las formas adecuadas dependen en parte del uso o de la vía de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica o mediante inyección.

Se conocen en la técnica otros factores e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y formas que evitan que la composición o formulación ejerza su efecto.

La presente divulgación también incluye composiciones preparadas para el almacenamiento o administración, que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los transportadores o diluyentes aceptables para el uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, se pueden proporcionar conservantes, estabilizadores, colorantes y agentes saborizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden utilizar agentes antioxidantes y de suspensión.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es la dosis necesaria para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar hasta cierto punto un síntoma, preferentemente todos los síntomas) de una enfermedad. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición utilizada, la vía de administración, el tipo de mamífero a tratar, las características físicas del mamífero específico en consideración, la medicación simultánea y otros factores que los expertos en las técnicas médicas reconocerán.

Las formulaciones de la divulgación se pueden administrar en formulaciones de unidad de dosificación que contengan transportadores, adyuvantes y/o vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones pueden estar en una forma adecuada para el uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos orgánulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas al uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más de tales agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes o agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y sabrosas. Los comprimidos contienen el principio activo en combinación con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para la fabricación de comprimidos.

Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga; agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido estérico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas. En algunos casos tales recubrimientos se pueden preparar mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de este modo un acción sostenida durante un periodo más prolongado. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formulaciones para el uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en combinación con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropil-metilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o de humectación pueden ser una fosfatida de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxiecetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales obtenidos de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato polioxietilén sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales obtenidos de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato polietilén sorbitán. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo los principios activos en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Suele añadirse agentes edulcorantes y agentes saborizantes para proporcionar preparaciones orales sabrosas. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua, proporcionan el principio activo en combinación con un agente dispersante o de humectación, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o de humectación o agentes de suspensión adecuados se ejemplifican mediante los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden estar en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma arábica o goma de tragacanto, fosfatidas de origen natural, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales obtenidos de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato polioxitilén sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y saborizantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol, glucosa o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante y agentes saborizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosas estéril inyectable.

Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes dispersantes o de humectación adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente.

Una preparación inyectable estéril puede también ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parentalmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites no volátiles estériles se emplean de forma convencional como medio disolvente o de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico hallan uso en la preparación de inyectables.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden administrarse en forma de supositorios, por ejemplo para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente que no produce irritación adecuado que sea sólido a las temperaturas normales, pero que sea líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacahuete y polietilenglicoles.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden administrarse por vía parenteral en un medio estéril. El fármaco, dependiendo del vehículo y de la concentración utilizados, puede suspenderse o disolverse en el vehículo. De manera ventajosa, pueden disolverse en el vehículo adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponadores.

Para la administración a animales que no sean seres humanos, la composición también puede añadirse al pienso o al agua de bebida. Puede ser conveniente formular las composiciones de pienso y de agua de bebida de forma que el animal tome una cantidad terapéuticamente apropiada de la composición junto con su dieta. También puede ser conveniente presentar la composición como una premezcla para la adición al pienso o al agua de bebida. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también se pueden administrar a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para aumentar el efecto terapéutico total. El uso de múltiples compuestos para tratar una indicación puede aumentar los efectos benéficos mientras se reduce la presencia de efectos secundarios.

Como alternativa, determinadas moléculas de ANip de la invención se pueden expresar en células a partir de promotores eucariotas. Los vectores recombinantes que tienen la capacidad de expresar moléculas de ANip pueden entregarse a, y persistir en, células diana. Como alternativa, los vectores se pueden utilizar para proporcionar la expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Si es necesario, tales vectores se pueden administrar de manera repetida. Una vez expresada, la molécula de ANip interactúa con el ARNm diana y genera una respuesta de ARNi. La entrega de vectores que expresan moléculas de ANip puede ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a células diana explantadas de un sujeto seguido de la reintroducción en el sujeto, o por cualquier otro medio que permita la introducción en la célula diana deseada.

Resultados

Ejemplo 1. Diseño de ANip.

Los números de Registro del GenBank que corresponden a las subunidades IL-12 p35 (Interleucina 12A, factor estimulante de linfocitos citolíticos naturales 1, factor de maduración de linfocitos citotóxicos 1, p35) y p40 (Interleucina 12B, factor estimulante de linfocitos citolíticos naturales 2, factor de maduración de linfocitos citotóxicos 2, p40), son NM_000882 y NM_002187, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos de ARNm correspondientes se introdujeron en el programa de predicción patentado descrito anteriormente, y se obtuvieron las moléculas de ANip dirigidas a actuar sobre las subunidades IL-12 p35 y p40. El resultado de estos análisis fue una puntuación de posibles oligonucleótidos de ANip, utilizándose las puntuaciones más elevadas para diseñar oligonucleótidos de ARN bicatenario (normalmente de 19 pb de largo), que normalmente se prepararon mediante síntesis química.

En realizaciones preferentes, las composiciones de ANip de la invención son cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-81 de la Figura 1; normalmente se administraron como un dúplex de la cadena codificante y de la cadena no codificante. La invención también abarca ANip que es de 40 nucleótidos o menos y comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO 1-81. En una realización específica, el ANip es de 21-30 nucleótidos de largo y comprende una o cualquiera de las SEQ ID NO 1-81 de la Figura 1. Todas las moléculas de ANip utilizadas en los experimentos descritos a continuación se diseñaron para tener una protuberancia 3' de 2 nucleótidos timidina.

Ejemplo 2. Ensayos *in vitro* para IL-12 p35.

Para determinar la inhibición del gen diana IL-12 p35, se ha analizado en cultivos celulares un panel de ARNip contenido en la Figura 1. Se seleccionaron para el análisis los ARNip con las mejores características y se aplicaron a los cultivos celulares apropiados, tales como SW480. El efecto del ARNip sobre el gen diana se analizó mediante RT-PCR de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Los niveles del transcrito del gen diana se normalizaron utilizando 18S como gen constitutivo. Algunos de los distintos ARNip analizados y sus distintas eficacias en la interferencia del gen diana se incluyen en la Figura 2. Estos resultados corresponden a las SEQ ID 8 y SEQ ID 17 de la Figura 1 en células SW480 que expresan p35. Los valores representan la media del porcentaje de los niveles de ARNm normalizados después de la interferencia por ARNip sobre el control de expresión génica y sus desviaciones estándar medias (DEM). El nivel del transcrito de p35 después del tratamiento con ARNip en SW480 se redujo de forma elevada con los ARNip correspondientes a las SEQ ID 8 y SEQ ID 17, en comparación con las células de control. La disminución de la expresión génica depende de la eficacia en el silenciamiento por ARNip. De hecho, el tratamiento con ARNip SEQ ID 8 disminuyó la expresión del gen p35 hasta el 56% a las 24h, en comparación con el control.

Ejemplo 3. Ensayos *in vitro* para IL-12 p40.

Para determinar la inhibición del gen diana IL-12 p40, se analizó el panel de ARNip contenido en la Figura 1. Los ARNip con las mejores características, diseñados como se describió anteriormente, se analizaron en células de ser humano y murinas. El nivel de transcrito de p40 se analizó mediante RT-PCR y se normalizó utilizando 18S como gen constitutivo. Estos resultados corresponden a las SEQ ID 67, SEQ ID 79, en células SW480 que expresan p40 (Figura 3A), y a las SEQ ID 86 y SEQ ID 87 en células C2C12 que expresan p40 (Figura 3B). Las moléculas de ANip SEQ ID 86 y SEQ ID 87 son como se describe en la Figura, con protuberancias 3' de 2 nucleótidos timidina.

El nivel del transcrito de p40 estaba reducido de forma muy elevada en SW480 después del tratamiento con el ARNip que corresponde a la SEQ ID 67, hasta el 65% en comparación con las células de control. En células C2C12, el ARNip que corresponde a la SEQ ID 86 disminuyó la expresión génica hasta el 61% a las 48 h en comparación con el control. Es importante indicar que las SEQ ID 67 y SEQ ID 86 corresponden a regiones homólogas del gen de IL-12 p40 de ser humano y de ratón, respectivamente.

En la siguiente Tabla se presenta un resumen de los experimentos de las Figuras 2 y 3:

		Expresión génica (%)	DEM
P35 (SW480)	Control	100	0
	SEQ ID 8, 24 h	56	13,9772455
	SEQ ID 8, 48 h	73	13,6336806
	SEQ ID 17, 24 h	67	17,8860754
	SEQ ID 17, 48 h	73	20,7305043
p40 (SW480)	Control	100	0
	SEQ ID 67, 24 h	65	8,58321816
	SEQ ID 67, 48 h	86	20,4353968
	SEQ ID 79, 24 h	69	17,8276602
	SEQ ID 79, 48 h	84	13,1055338
p40 (C2C12)	Control	100	0
	SEQ ID 86, 24 h	121	13,8703694
	SEQ ID 86, 48 h	61	23,4419624

	SEQ ID 87, 24 h	108	35,8061452
	SEQ ID 87, 48 h	85	17,1974522

Ejemplo 4. Ensayos *in vivo*. Análisis del intestino delgado.

5 La aplicación de ARNip se hace para determinar la entrega de ARNip apropiada en el intestino. Para determinar el efecto del ARNip, se recogieron muestras de intestino delgado en medio OCT y se analizaron como se describió anteriormente. Dado que el objetivo es determinar la regulación por disminución del transcrito del gen de la GFP, se midieron los niveles de fluorescencia después de la aplicación de ARNip. Durante los protocolos experimentales no se observaron efectos secundarios en los animales.

10 El primer grupo de trabajo (animales 2 y 3) se trató con una única dosis de 250 µg de ARNip y se sacrificaron los animales 48 h más tarde. Los resultados indican una disminución significativa de la fluorescencia cuando se compara con el ratón de control. Además, cuando se administró el ARNip (250 µg) en dos dosis de 125 µg y se analizó 48 h después de la primera inyección, la disminución de la expresión de la GFP fue similar a la de después de una única aplicación. Los resultados se muestran en la Figura 4. Para cada condición experimental se representa un promedio de los datos.

15 Al mismo tiempo, para confirmar los datos previos se recogieron muestras de intestino delgado en RNA later. Los niveles de ARNm se midieron mediante RT-PCR. Estos resultados, mostrados en la Figura 5, confirman los resultados previos obtenidos por análisis de fluorescencia.

20 Como se muestra en la Figura 5, la dosis administrada de 250 µg de ARNip, en una o dos aplicaciones, fue suficiente y adecuada para regular por disminución el nivel de ARNm de la GFP en intestino delgado, confirmando la entrega del ARNip en el intestino delgado mediante administración intrarrectal. El nivel de la regulación por disminución en comparación con el control es más elevado cuando el análisis se realiza mediante RT-PCR, debiéndose esto a la mayor sensibilidad de la técnica.

Ejemplo 5: Ensayos *in vivo*. Análisis del intestino grueso.

30 Adicionalmente, se analizó el intestino grueso del mismo modo que el intestino delgado. Para determinar el efecto del ARNip en el intestino grueso, se analizaron muestras recogidas en medio OCT para determinar la regulación por disminución de la GFP mediante la medición de la fluorescencia después de la aplicación de ARNip. Los resultados indican una disminución significativa de la fluorescencia cuando se compara con el ratón de control (Figura 6). Además, cuando la dosis se administró en dos aplicaciones de 125 µg y se analizó 48 h después de la primera inyección, el descenso fue muy similar al obtenido después de una única administración de ARNip, demostrando la eficacia del tratamiento.

35 Como en el intestino delgado, las muestras de intestino grueso se recogieron en RNA later y los se representan datos de los niveles de ARNm en la Figura 7. Los datos obtenidos mediante RT-PCR confirman los datos previos obtenidos por análisis de fluorescencia. Estos resultados abren una nueva vía para la administración terapéutica de ARNip para el tratamiento de enfermedades intestinales.

40 Los datos de las muestras recogidas en medio OCT y en RNA later se resumen en las Figuras 8 y 9, respectivamente.

45 Los inventores también investigaron si existía alguna regulación por disminución de la expresión de la GFP en otros tejidos seleccionados de los ratones; no se observó regulación por disminución en tejidos de vejiga, riñón, pulmón, ovario e hígado, sugiriendo que la administración intrarrectal de ARNip puede utilizarse para actuar de forma específica sobre tejido intestinal.

50 REFERENCIAS

Akashi H, Miyagishi M, Taira K. Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001, 11(6):359-67.

55 Banerjee D, Slack F. Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *Bioessays*, 2002, 24(2): 119-29.

Bosher JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): E31-6.

60

- Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, Ryffel B, Cambi A, Figdor C, Vainchenker W, Galy A, Caignard A, Zitvogel L. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood*, 15 de noviembre de 2004;104(10):3267-75.
- 5 Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. y Morgan, R.A. Specific inhibition of gene expression by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 2001;98: 9742-9747.
- Caspi RR. IL-12 in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol.*, 1998;88(1):4-13.
- 10 Davidson NJ, Hudak SA, Lesley RE, Menon S, Leach MW, Rennick DM. IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol.*, 1998; 161(6):3143-9.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15(2):188-200.
- 15 Fais S, Capobianchi MR, Silvestri M, Mercuri F, Pallone F, Dianzani F. Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and - alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *J Interferon Res.*, 1994;14(5):235-8.
- 20 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669):806-11.
- Flynn MA, Casey DG, Todryk SM, Mahon BP. Efficient delivery of small interfering RNA for inhibition of IL-12p40 expression in vivo. *J Inflamm (Lond)*, 1 de octubre de 2004; 1(1):4.
- 25 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol.*, 1996;157(3):1261-70.
- 30 Gately M K, Renzetti L M, Magram J, Stern A S, Adorini L, Gubler U, Presky D H. The interleukin-12/interleukin-12- receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998;16:495-521.
- 35 Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, 2000, 5(2):107-14.
- Grosshans H, Slack FJ. Micro-RNAs: small is plentiful. *J Cell Biol*, 2002, 156(1):17-21.
- 40 Hill JA, Ichim TE, Kuznierz KP, Li M, Huang X, Yan X, Zhong R, Cairns E, Bell DA, Min WP. Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA. *J Immunol.*, 15 de septiembre de 2003;171(6):3303.
- Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005, 438(7068):685-9.
- 45 Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W; Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med.*, 2004; 351(20): 2069-79.
- 50 Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*, 1997; 112(4):1169-78.
- 55 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med.*, 1995; 182(5): 1281-90.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 2002, 16(8):948-58.
- 60 Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol.*, 1997; 150(3):823-32.
- 65 Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol.*, 1997; 159(12):6276-82.

Simpson SJ, Shah S, Comiskey M, de Jong YP, Wang B, Mizoguchi E, Bhan AK, Terhorst C. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *J Exp Med.*, 1998; 187(8):1225-34.

5 Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol*, 1998 ;70:83-243.

Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.*, 1999; 13(24):3191-7.

10 Vandembroeck K, Alloza I, Gadina M, Matthys P. Inhibiting cytokines of the interleukin-12 family: recent advances and novel challenges. *J Pharm Pharmacol.*, 2004, 56(2):145-60.

15 Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol.*, 2000, 2(2):70-5.

Williams BR. Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans*, 1997, 25(2):509-13.

20 En las siguientes cláusulas se describen aspectos adicionales de la divulgación:

A. Un método eficaz de tratamiento de un trastorno intestinal que comprende administrar a un paciente un compuesto que provoca interferencia por ARN por vía intrarrectal.

25 B. El método de la cláusula A, en el que el trastorno es un trastorno del intestino delgado.

C. El método de la cláusula A, en el que el trastorno es un trastorno del intestino grueso.

30 D. El método de la cláusula A, en el que el trastorno es un trastorno del recto.

E. El método de la cláusula A, en el que el trastorno se selecciona del grupo que comprende: enfermedades hiperproliferativas, en particular, cáncer colorrectal; enfermedades autoinmunitarias e inflamatoria intestinal (EII), en particular la enfermedad de Crohn; colitis, en particular colitis ulcerosa; síndrome del intestino irritable; enfermedades infecciosas del intestino, tales como colitis pseudomembranosa, amebosis o tuberculosis intestinal; pólipos del colon; enfermedad diverticular; estreñimiento; oclusión intestinal; síndromes de malabsorción; enfermedades del recto y diarrea.

F. El método de cualquier cláusula precedente en el que el compuesto modula la expresión de un gen diana con niveles alterados en un paciente que necesite tratamiento.

40 G. El método de la cláusula F en el que la expresión del gen diana se modula en una célula que no sea una célula dendrítica.

45 H. El método de la cláusula G en el que la expresión del gen diana se modula en una célula epitelial intestinal.

I. El método de cualquier cláusula precedente en el que el compuesto es ANip.

J. El método de la cláusula I en el que el ANip es ARNip.

50 K. El método de la cláusula I en el que el ANip es ARNbc.

L. El método de la cláusula I en el que el ANip es ARNhc.

55 M. El método de cualquier cláusula precedente en el que el compuesto modula los niveles de miARN.

N. El método de cualquier cláusula precedente en el que el compuesto comprende un oligonucleótido modificado.

O. El método de cualquiera de las cláusulas I a L en el que el ANip es de 40 pares de bases o menos, de longitud.

60 P. El método de cualquiera de las cláusulas I a L en el que el ANip tiene protuberancias 3'.

Q. El método de la cláusula P en el que las protuberancias 3' son dinucleótidos.

65 R. El método de la cláusula Q en el que las protuberancias de dinucleótidos está formadas por nucleótidos timidina.

- S. El método de cualquier cláusula precedente en el que se utiliza una pluralidad de especies del compuesto.
- 5 T. El método de la cláusula S en el que dicha pluralidad de especies va dirigido hacia las mismas especies de ARNm.
- U. El método de la cláusula S en el que dicha pluralidad de especies va dirigido hacia distintas especies de ARNm.
- 10 V. El método de cualquier cláusula precedente en el que el compuesto modula la expresión de un gen diana implicado en una enfermedad inflamatoria intestinal (EII).
- W. El método de la cláusula V en el que la EII es enfermedad de Crohn.
- 15 X. El método de la cláusula V o W en el que el gen diana es interleucina 12.
- Y. El método de la cláusula V, W o X en el que el compuesto es ANip.
- 20 Z. El método de la cláusula Y en el que el ANip se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 85.
- AA. El método de la cláusula Y en el que la ANip es de cuarenta pares de bases o menos, de longitud y comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 85.
- 25 AB. El método de la cláusula AA en el que el ANip va dirigido hacia la subunidad de 35 kDa de la interleucina 12 (IL12-p35) y comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 33.
- 30 AC. El método de la cláusula AA en el que el ANip va dirigido hacia la subunidad de 40 kDa de la interleucina 12 (IL12-p40) y comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 34 a SEQ ID NO 85.
- AD. Uso de un compuesto que provoca interferencia por ARN en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno intestinal, en el que el compuesto se administra por vía intrarrectal a un paciente.
- 35 AE. Uso de ANip que va dirigido hacia IL-12 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno intestinal.
- 40 AF. El uso de la cláusula AE en la que el trastorno intestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal (EII).
- AG. El uso de la cláusula AF en la que la EII es enfermedad de Crohn.
- 45 AH. El uso de la cláusula AE a AG en las que el ANip se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 85.
- AI. Un compuesto de iARN que va dirigido hacia la interleucina 12, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 85.
- 50 AJ. El compuesto de la cláusula AI en la que la iARN es ARNbc, ARNip o ARNhc.
- AK. El compuesto de la cláusula AI que va dirigido hacia la subunidad de 35 kDa de la interleucina 12 y L12-p35) que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 33.
- 55 AL. El compuesto de la cláusula AI que va dirigido hacia la subunidad de 40 kDa de la interleucina 12 (IL12-p40), que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 34 a SEQ ID NO 85.
- 60 AM. Una composición farmacéutica que comprende una o una pluralidad de ANip de la cláusula AI.
- AN. La composición de la cláusula AM, formulada para la administración intrarrectal.
- 65 AO. Una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno intestinal que comprende un compuesto que provoca interferencia por ARN, formulado para la administración intrarrectal.
- AP. Un método para la inhibición de la expresión de IL12-p40 y/o IL12-p35 en células o tejidos *ex vivo*, que

comprende tratar dichas células o tejidos con el compuesto de cualquiera de las cláusulas AI a AL, de modo que la expresión de IL-p40 y/o IL12-p35 esté inhibida.

AQ. Un método para la inhibición de la expresión de IL12-p40 y/o IL12-p35 en un paciente que comprende tratar a dicho paciente con el compuesto de cualquiera de las cláusulas AI a AL, de modo que la expresión de IL12-p40 y/o IL12-p35 esté inhibida.

AR. El uso de un compuesto de cualquiera de las cláusulas AI a AL en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con IL12-p40 y/o IL12-p35, en el que dicho medicamento inhibe la expresión de IL12-p40 y/o IL12-p35.

AS. El uso de la cláusula AR en la que la enfermedad es un trastorno autoinmunitario o una enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

AT. El uso de la cláusula AS en la que el trastorno es esclerosis múltiple, diabetes o enfermedad de Crohn.

AU. Un método para actuar de forma específica sobre tejido intestinal por interferencia por ARN, que comprende administrar a un paciente por vía intrarrectal un compuesto que provoca interferencia por ARN.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genomica

<120> tratamiento de afecciones intestinales

<130> WPP290381

<140> PCT/GB2006/050051
<141> 14-03-2006

<150> GB0505081.0
<151> 14-03-2005

<160> 90

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> ARNip que va dirigido hacia IL-12

<400> 1
uguucccaug ccuucacca 19

<210>2
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> ARNip que va dirigido hacia IL-12

<400> 2
aaccugcuga gggccguca 19

<210> 3
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> ARNip que va dirigido hacia IL-12

ES 2 587 252 T3

	<400> 3 19 caugcuccag aaggccaga	19
5	<210> 4 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
15	<400> 4 ggccagacaa acucuagaa	19
20	<210> 5 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
30	<400> 5 aaccagcaca guggaggcc	19
35	<210> 6 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 6 accagcacag uggaggccu	19
50	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
60	<400> 7 ccaagaauga gaguugccu	19
65	<210> 8 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 8 gaaugagagu ugccuaau	19
	<210> 9 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

	<400> 9 ugagaguugccuaauucc	19
5	<210> 10 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 10 auuccagaga gaccuuu	19
15	<210> 11 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 11 uuccagagag accuuuuc	19
30	<210> 12 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 12 cuaaugggag uugccuggc	19
40	<210> 13 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 13 gacuugaaga uguaccagg	19
50	<210> 14 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 14 gauguaccag guggaguuc	19
60	<210> 15 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

	<400> 15 gaccaugaau gcaaagcuu	19
5	<210> 16 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 16 ugcaaagcuu cugauggau	19
15	<210> 17 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 17 agcuucugau ggauccuaa	19
	<210> 18 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 18 gcuucugaug gauccuaag	19
	<210> 19 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 19 gaggcagaucuuucuaagau	19
	<210> 20 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
50	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 20 aacaugcugg caguuaug	19
	<210> 21 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

	<400> 21 acaugcuggc aguuauuga	19
5	<210> 22 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 22 caugcuggca guuauugau	19
15	<210> 23 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 23 uuucaacagu gagacugug	19
30	<210> 24 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 24 cagugagacu gugccaca	19
40	<210> 25 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 25 aaauccuccc uugaagaac	19
50	<210> 26 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 26 aauccucccu ugaagaacc	19
60	<210> 27 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

ES 2 587 252 T3

	<400> 27 auccuccuu gaagaaccg	19
5	<210> 28 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 28 uccuccuug aagaaccgg	19
15	<210> 29 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 29 aaucaagcuc ugcauacuu	19
30	<210> 30 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 30 aucaagcucugcauacuuc	19
40	<210>31 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 31 ucaagcucug cauacuucu	19
50	<210> 32 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 32 gcucugcaua cuucucau	19
60	<210> 33 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

ES 2 587 252 T3

	<400> 33 uucgggcagu gacuaauga	19
5	<210> 34 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 34 uuggauuggu auccggaug	19
15	<210> 35 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 35 auggugguccucaccugug	19
30	<210> 36 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 36 uggugguccu caccuguga	19
40	<210> 37 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 37 gaagauggua ucaccugga	19
50	<210> 38 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 38 gaugguauca ccuggaccu	19
60	<210> 39 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

	<400> 39 aaccugacc auccaaguc	19
5	<210> 40 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
15	<400> 40 accugacca uccaaguca	19
20	<210>41 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
30	<400> 41 cccugaccau ccaagucaa	19
35	<210> 42 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 42 gucaaagagu uuggagaug	19
50	<210> 43 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
60	<400> 43 agaguuuugga gaugcuggc	19
65	<210> 44 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
75	<400> 44 gaguuuuggag augcuggcc	19
80	<210> 45 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

ES 2 587 252 T3

	<400> 45 aggaggcgag guucuaagc	19
5	<210> 46 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 46 ggaggcgagg uucuaagcc	19
15	<210> 47 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 47 gccauucgcu ccugcugcu	19
30	<210> 48 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 48 aaaggaagau ggaauuugg	19
40	<210> 49 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 49 aaggaaug gaauuuggu	19
50	<210> 50 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 50 aggaaugg aauuugguc	19
60	<210>51 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

	<400>51 ggaagaugga auuuggucc	19
5	<210> 52 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
15	<400> 52 gauggaauuu gguccacug	19
20	<210> 53 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
30	<400> 53 aggaccagaa agaaccxaa	19
35	<210> 54 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 54 ggaccagaaa gaaccxaa	19
50	<210> 55 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
60	<400> 55 uaagaccuuu cuaaaguc	19
65	<210> 56 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 56 gaccuuucua agaugcgag	19
	<210> 57 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

ES 2 587 252 T3

	<400> 57 gaugcgaggccaagaauua	19
5	<210> 58 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
15	<400> 58 gaauuauucu ggacguuuc	19
20	<210> 59 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
30	<400> 59 uuauucugga cguuucacc	19
35	<210> 60 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 60 aagcagcaga ggcucuucu	19
50	<210> 61 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
60	<400> 61 agcagcagag gcucuucug	19
65	<210> 62 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 62 gcagcagagg cucuucuga	19
	<210> 63 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

ES 2 587 252 T3

	<400> 63 caaggaguau gaguacuca	19
5	<210> 64 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 64 ggaguaugag uacucagug	19
15	<210> 65 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 65 aacuacacca gcagcuucu	19
30	<210> 66 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 66 acuacaccag cagcuucuu	19
40	<210> 67 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 67 cuacaccagc agcuucuuc	19
50	<210> 68 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 68 accugacca cccaagaac	19
60	<210> 69 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

	<400> 69 ccugaccac ccaagaacu	19
5	<210> 70 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
15	<400> 70 gaacuugcag cugaagcca	19
20	<210> 71 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
30	<400> 71 cuugcagcug aagccauua	19
35	<210> 72 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 72 gccauuaaag aaucucgg	19
50	<210> 73 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
60	<400> 73 agaauucug gcaggugga	19
65	<210> 74 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 74 gaaucucgg cagguggag	19
	<210> 75 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

ES 2 587 252 T3

	<400> 75 uucucggcag guggagguc	19
5	<210> 76 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
	<400> 76 agaaagauag agucuucac	19
15	<210> 77 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 77 gaaagauaga gucuucacg	19
	<210> 78 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 78 agauagagucuucacggac	19
	<210> 79 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 79 gauagagucu ucacggaca	19
	<210> 80 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
50	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 80 gaccucagcc acggucauc	19
	<210> 81 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

ES 2 587 252 T3

	<400> 81 aaaugccagc auuagcgug	19
5	<210> 82 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
15	<400> 82 aaugccagca uuagcgugc	19
20	<210> 83 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
25	<400> 83 augccagcau uagcgugcg	19
30	<210> 84 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
35	<400> 84 ugccagcauu agcgugcgg	19
40	<210> 85 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
45	<400> 85 ugggcaucug ugcccugca	19
50	<210> 86 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
55	<400> 86 cuacagcacc agcuucuuc	19
60	<210> 87 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	
65	<220> <223> ARNip que va dirigido hacia IL-12	

ES 2 587 252 T3

	<code><400> 87</code>		
	<code>gcacggcagc agaauaaa</code>		19
5	<code><210> 88</code>		
	<code><211> 21</code>		
	<code><212> ARN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
10	<code><220></code>		
	<code><223> ARNip que va dirigido hacia IL-12</code>		
	<code><400> 88</code>		
	<code>ggcuacguccaggagcgacc</code>		21
15	<code><210> 89</code>		
	<code><211> 18</code>		
	<code><212> ARN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
20	<code><220></code>		
	<code><223> ARNip que va dirigido hacia IL-12</code>		
	<code><400> 89</code>		
25	<code>ggcuacguccagcgacc</code>		18
	<code><210> 90</code>		
	<code><211> 21</code>		
	<code><212> ARN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
30	<code><220></code>		
	<code><223> ARNip que va dirigido hacia IL-12</code>		
	<code><400> 90</code>		
35	<code>ugcgcuccuggacguagccuu</code>		21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un ácido nucleico interferente pequeño (ANip) que provoca interferencia por ARN de la interleucina 12 (IL-12) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en el que el ANip se administra a un paciente por vía intrarrectal y dicha interferencia por ARN se produce en tejido intestinal pero no en tejido de vejiga, riñón, pulmón, ovario o hígado.
- 10 2. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el trastorno es un trastorno del intestino delgado, del intestino grueso o del recto.
- 15 3. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona del grupo que comprende: enfermedad de Crohn, colitis, y en particular colitis ulcerosa, y síndrome del intestino irritable.
4. El uso de la reivindicación 3, en donde la EII es enfermedad de Crohn.
5. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el ANip se selecciona de: ARNbc, ARNip o ARNhc.
6. El uso de la reivindicación 5, en donde el compuesto comprende un oligonucleótido modificado.
- 20 7. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en donde el ANip tiene una longitud de 40 pares de bases o menos.
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde el ANip tiene protuberancias 3'.
- 25 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dichas protuberancias 3' son dinucleótidos.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dichas protuberancias de dinucleótidos están formadas por nucleótidos timidina.
- 30 11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se utiliza una pluralidad de especies del compuesto.
- 35 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha pluralidad de especies está dirigida hacia la misma especie de ARNm.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha pluralidad de especies está dirigida hacia distintas especies de ARNm.
- 40 14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ANip se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 85.
- 45 15. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que comprende un ácido nucleico interferente pequeño (ANip) que provoca interferencia por ARN de la interleucina 12 (IL-12), en donde dicha composición se formula para administración intrarrectal, y en donde dicha interferencia por ARN se produce en tejido intestinal pero no en tejido de vejiga, riñón, pulmón, ovario o hígado.
16. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende un o una pluralidad de ANip.
- 50 17. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo definido en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 85.

Fig. 1

11-12 p35	
SEQ ID 1	5' UGUUCCCAUGCCUUCACCA 3' 3' ACAAGGGUACGGAGUGGU 5'
SEQ ID 2	5' AACCGUCUGAGGGCCGUC 3' 3' UUGGACGACUCCGGCAGU 5'
SEQ ID 3	5' CAUGCUCACAGAAAGCCAGA 3' 3' GUACGAGBUCUCCGGUCU 5'
SEQ ID 4	5' GGCCAGACAAACUCUAGAA 3' 3' CCGGUCUGUUGAGAUUU 5'
SEQ ID 5	5' AACCGACACAGUGGAGGCC 3' 3' UUGGUCGUGUACCCUCCGG 5'
SEQ ID 6	5' ACCAGCACAGUGGAGGCCU 3' 3' UGGUCGUGUACCCUCCGGA 5'
SEQ ID 7	5' CCAAGAAUGAGAGUUGCCU 3' 3' GGUUCUACUCUCAACGGA 5'
SEQ ID 8	5' GAAUGAGAGUUGCCUAAAU 3' 3' CUUACUCUCAACGGAUUA 5'
SEQ ID 9	5' UGAGAGUUGCCUAAAUUCC 3' 3' ACUCUCAACGGAUUAAGG 5'
SEQ ID 10	5' AUUCCGAGAGACCUCUUU 3' 3' UAAGGUCUCUCUGGAGAAA 5'
SEQ ID 11	5' UUCCAGAGAGACCUCUUUC 3' 3' AAGGUCUCUCUGGAGAAAG 5'
SEQ ID 12	5' CUAUUGGGAGUUGCCUGGC 3' 3' GAUUAACCUCAACGGACCG 5'
SEQ ID 13	5' GACUUGAAGAUGUACCAGG 3' 3' CUGAACUUCVACAUGGUCC 5'
SEQ ID 14	5' GAUGUACCAGGUGGAGUUC 3' 3' CUACAUGGUCCACCUCAAAG 5'
SEQ ID 15	5' GACCAUGAAUGCAAAGCUU 3' 3' CUGGUACUUAACGUUUCGAA 5'
SEQ ID 16	5' UGCAAGCUUCUGAUGGANU 3' 3' ACGUUUCGAAAGACUACCUA 5'
SEQ ID 17	5' AGCUUCUGAUGGAUCCUAA 3' 3' UCGAAGACUACCUAGGAUU 5'
SEQ ID 18	5' GCUUCUGAUGGAUCCUAAAG 3' 3' CGAAGACUACCUAGGAUUC 5'
SEQ ID 19	5' GAGGCAGAUUUUCUAGAU 3' 3' CUCCGUCUAGAAAGAUUA 5'
SEQ ID 20	5' AACAUUCUGGCAGUUUUUG 3' 3' UUGUACGACCGUCAAUUAC 5'
SEQ ID 21	5' ACAUGCUGGCAGUUUUUGA 3' 3' UGUACGACCGUCAAUUACU 5'
SEQ ID 22	5' CAUGCUGGCAGUUUUUGAU 3' 3' GUACGACCGUCAAUUACUA 5'

SEQ ID 23	5' UUUCAACAGUGAGACUGUG 3' 3' AAAGUUGUCACUCUGACAC 5'
SEQ ID 24	5' CAGUGAGACUGUGCCACAA 3' 3' GUCACUCUGACACGGUGUU 5'
SEQ ID 25	5' AAAUCCUCCCUUGAAGAAC 3' 3' UUUAGGAGGGAACUUCUUG 5'
SEQ ID 26	5' AAUCCUCCCUUGAAGAACC 3' 3' UUAGGAGGGAACUUCUUGG 5'
SEQ ID 27	5' AUCCUCCCUUGAAGAACC 3' 3' UAGGAGGGAACUUCUUGGC 5'
SEQ ID 28	5' UCCUCCCUUGAAGAACC 3' 3' AGGAGGGAACUUCUUGGCC 5'
SEQ ID 29	5' AAUCAAGCUCUGCAUACUU 3' 3' UUAGUUCGAGACGUUUGAA 5'
SEQ ID 30	5' AUCAAGCUCUGCAUACUUC 3' 3' UAGUUCGAGACGUUUGAAG 5'
SEQ ID 31	5' UCAAGCUCUGCAUACUUCU 3' 3' AGUUCGAGACGUUUGAAGA 5'
SEQ ID 32	5' GCUCUGCAUACUUCUUCAU 3' 3' CGAGACGUUUGAAGAAGUA 5'
SEQ ID 33	5' UUCGGGCAGUGACUUAUUGA 3' 3' AAGCCCGUCACUGAUUACU 5'

IL-12 p40	
SEQ ID 34	5' UUGGAUUGCUAUCCCGAUG 3' 3' AACCUAACCAUAGGCCUAC 5'
SEQ ID 35	5' AUGGUGGUCCUACCCUGUG 3' 3' UACCACCAGGAGUGGACAC 5'
SEQ ID 36	5' UUGGUGGUCCUACCCUGUGA 3' 3' ACCACCAGGAGUGGACACU 5'
SEQ ID 37	5' GAAGAUGGUUACCCUGGA 3' 3' CUUCUACCAUAGUGGACCU 5'
SEQ ID 38	5' GAUGGUUACCCUGGACCU 3' 3' CUACCAUAGUGGACCUUGGA 5'
SEQ ID 39	5' AACCCUGACCAUCCAAGUC 3' 3' UUGGGACUGGUAGGUUCAG 5'
SEQ ID 40	5' ACCCUGACCAUCCAAGUCA 3' 3' UGGGACUGGUAGGUUCAGU 5'
SEQ ID 41	5' CCCUGACCAUCCAAGUCA 3' 3' GGGACUGGUAGGUUCAGUU 5'
SEQ ID 42	5' GUCALAGAGUUUGGAGAGG 3' 3' CAGUUFUCUCAAACCUUAC 5'
SEQ ID 43	5' AGAGUUUGGAGAUUCUUGC 3' 3' UCUCAAACCUUACGACCG 5'
SEQ ID 44	5' GAGUUUGGAGAUUCUUGCC 3' 3' CUCAAACCUUACGACCGG 5'

SEQ ID 45	5' AGGAGGCGAGGUUCUAAGC 3'
SEQ ID 46	3' UCCUCCGCUCCAAGAUJCG 5' 5' GGAGGCGAGGUUCUAAGCC 3' 3' CCUCCGCUCCAGAUUCGG 5'
SEQ ID 47	5' GCCAUUCGCUCCUGCUGCU 3' 3' CGGUAAGCGAGGACGACGA 5'
SEQ ID 48	5' AAAGGAAAGAUUGGAAUUUGG 3' 3' UUUCCUUCUACCUUAAACC 5'
SEQ ID 49	5' AAGGAAGAUUGGAAUUUGGU 3' 3' UUCUUCUACCUUAAACCA 5'
SEQ ID 50	5' AGGAAAGAUUGGAAUUUGGU 3' 3' UCCUUCUACCUUAAACCAG 5'
SEQ ID 51	5' GGAAGAUUGGAAUUUGGUCC 3' 3' CCUUCUACCUUAAACCAGG 5'
SEQ ID 52	5' GAUGGAAUUUGGUCCACUG 3' 3' CUACCUUAAACCAGGUGAC 5'
SEQ ID 53	5' AGGACCAGAAAGAACCCRA 3' 3' UCCUGGUCUUUCUUGGGUU 5'
SEQ ID 54	5' GGACCAGAAAGAACCCAAA 3' 3' CCUGGUCUUUCUUGGGUU 5'
SEQ ID 55	5' DAAGACCUUCUAAGAUGC 3' 3' AUUCGGAAAGAUUCUACG 5'
SEQ ID 56	5' GACCUUUCUAAGAUGCAG 3' 3' CUGGAAAGAUUCUACGCUC 5'
SEQ ID 57	5' GAUGCGAGGCCAAGAAUUA 3' 3' CUACGCUCCGGUUCUAAU 5'
SEQ ID 58	5' GAUUUAUUCUGGACGUUUC 3' 3' CUUAUAAGACCUGCAAG 5'
SEQ ID 59	5' UUAUUCUGGACGUUUCACC 3' 3' AAUAAGACCUGCAAGUGG 5'
SEQ ID 60	5' AAGCAGCAGAGGCUUCU 3' 3' UUCGUCGUCUCCGAGAAGA 5'
SEQ ID 61	5' AGCAGCAGAGGCUUCUG 3' 3' UCGUCGUCUCCGAGAAGAC 5'
SEQ ID 62	5' GCAGCAGAGGCUUCUGA 3' 3' CGUCGUCUCCGAGAAGACU 5'
SEQ ID 63	5' CAAGGAGUAUGAGUACUCA 3' 3' GUUCCUAUACUCAUGAGU 5'
SEQ ID 64	5' GGAGUAUGAGUACUCAGUG 3' 3' CCUCAUACUCAUGAGUCAC 5'
SEQ ID 65	5' AACUACACCAGCAGCUUCU 3' 3' UUGAUGUGGUCGCGAAGA 5'
SEQ ID 66	5' ACUACACCAGCAGCUUCU 3' 3' UGAGUGGUCGCGAAGA 5'
SEQ ID 67	5' CUACACCAGCAGCUUCU 3' 3' GAUGUGGUCGCGAAGAAG 5'

ES 2 587 252 T3

SEQ ID 68	5' ACCUGACCCACCCAGAAC 3'
	3' UGGACUGGGUGGUUCUUG 5'
SEQ ID 69	5' CCUGACCCACCCAGAACU 3'
	3' GGACUGGGUGGUUCUUGA 5'
SEQ ID 70	5' GAACUUGCAGCUGAAGCCA 3'
	3' CUUGAACGUCGACUUCGQU 5'
SEQ ID 71	5' CUUGCAGCUGAAGCCAUA 3'
	3' GAACGUCGACUUCGUAUU 5'
SEQ ID 72	5' GCCAUUAAAGAAUUCUCGG 3'
	3' CGGUAUUUCUUAAGAGCC 5'
SEQ ID 73	5' AGAAUUCUCGGCAGGUGGA 3'
	3' UCUUAAGAGCCGUCCACCU 5'
SEQ ID 74	5' GAAUUCUCGGCAGGUGGAG 3'
	3' CUUAAGAGCCGUCCACUUC 5'
SEQ ID 75	5' UUCUCGGCAGGUGGAGGUC 3'
	3' AAGAGCCGUCCACUCCAG 5'
SEQ ID 76	5' AGAAAGAUAGAGUCUUCAC 3'
	3' UCUUCUAUCUCAGAAGUG 5'
SEQ ID 77	5' GAAAGAUAGAGUCUUCACG 3'
	3' CUUUCUAUCUCAGAAGUGC 5'
SEQ ID 78	5' AGAUAGAGUCUUCACCGAC 3'
	3' UCUAUCUCAGAAGUGCCUG 5'
SEQ ID 79	5' GAUAGAGUCUUCACGGACA 3'
	3' CUAUCUCAGAAGUGCCUGU 5'
SEQ ID 80	5' GACCUCAGCCACGGUCAUC 3'
	3' CUGGAGUCGGUGCCAGUAG 5'
SEQ ID 81	5' AAUUGCCAGCAUAGCGUG 3'
	3' UUUACGGUCGUAAUCGCAC 5'
SEQ ID 82	5' AAUUGCCAGCAUAGCGUGC 3'
	3' UUACGGUCGUAAUCGCACG 5'
SEQ ID 83	5' AUGCCAGCAUAGCGUGCC 3'
	3' UACGGUCGUAAUCGCACGC 5'
SEQ ID 84	5' UGCCAGCAUAGCGUGCCG 3'
	3' ACGGUCGUAAUCGCACGCC 5'
SEQ ID 85	5' UGGCAUCUGUGCCUUGCA 3'
	3' ACCCGUAGACCGGACGU 5'

Fig. 2

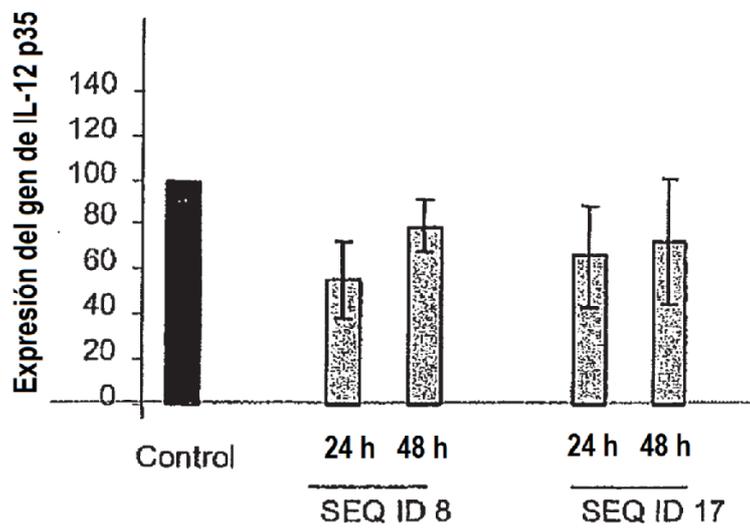
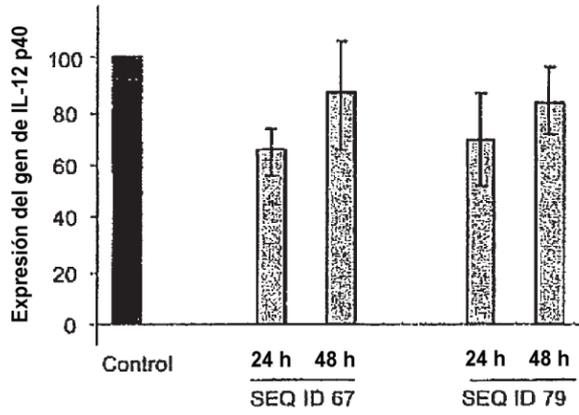
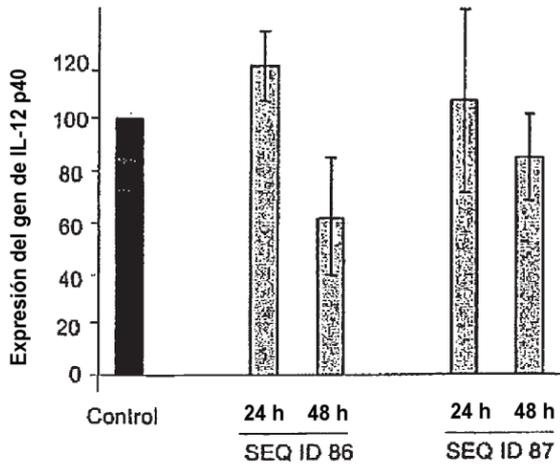


Fig. 3

A



B



SEQ ID 86

5' CUACAGCACCAGCUUCUUC 3'
 |||
 3' GAUGUCGUGGUCGAAGAAG 5'

SEQ ID 87

5' GCACGGCAGCAGAAUAAAU 3'
 |||
 3' CGUGCCGUCGUCUUAUUUA 5'

Fig. 4.

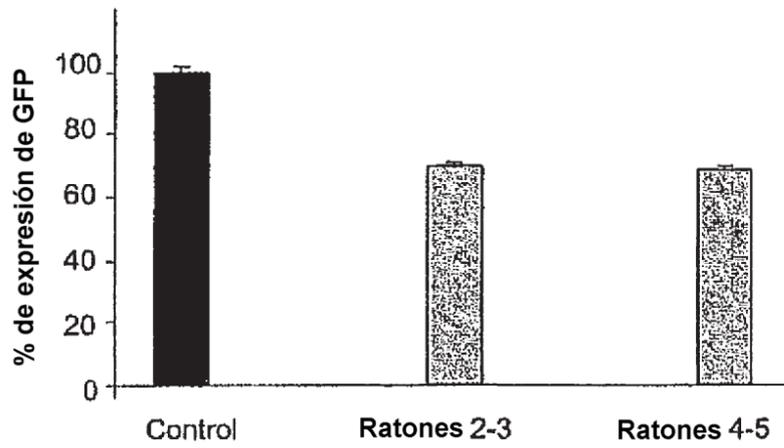


Fig. 5.

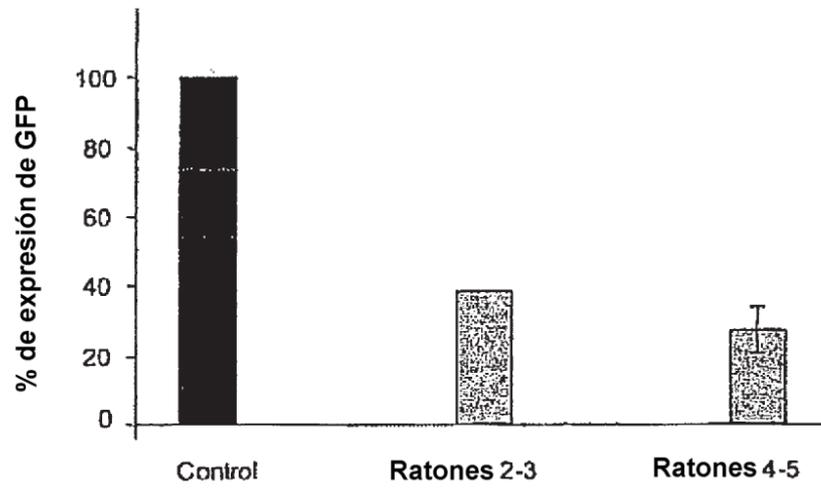


Fig. 6

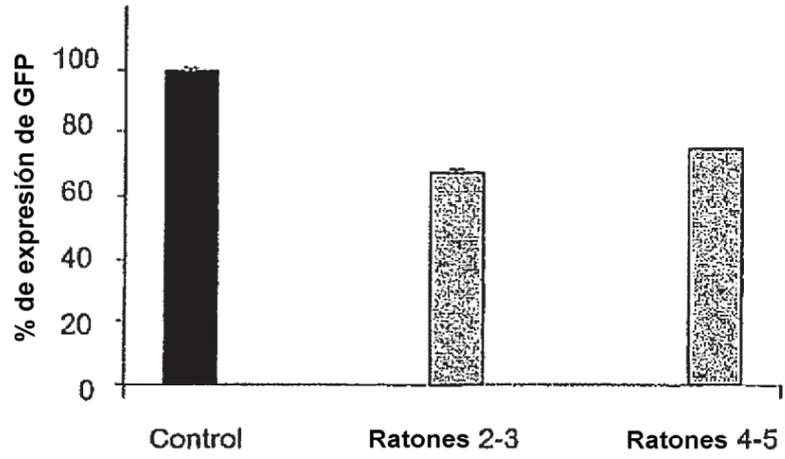


Fig. 7

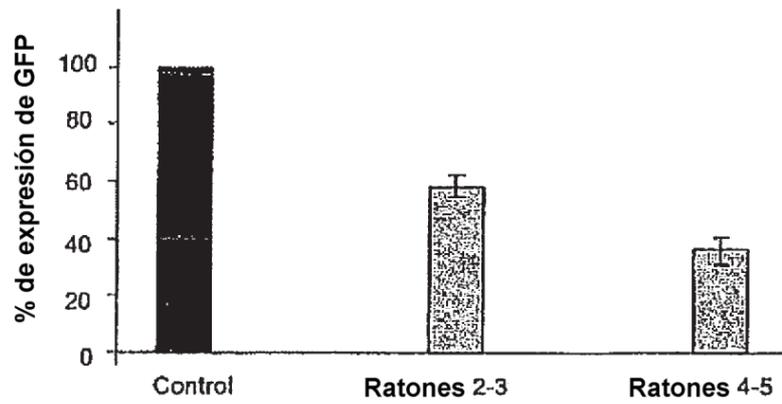


Fig. 8

Intestino delgado	% de expresión de GFP	DEM	Intestino grueso	% de expresión de GFP	DEM
Control	100	1,54	Control	100	0,47
Ratones 2-3	70	0,7	Ratones 2-3	68	0,26
Ratones 4-5	69	0,59	Ratones 4-5	75	0,33

Fig. 9:

Intestino delgado	% de expresión de GFP	DEM	Intestino grueso	% de expresión de GFP	DEM
Control	100	0	Control	100	0
Ratones 2-3	38	0	Ratones 2-3	58	3,7
Ratones 4-5	27	6,3	Ratones 4-5	36	4,9