

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 919**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/711** (2006.01)

**A61P 7/10** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2008 E 13177620 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2656850**

54 Título: **Oligonucleótidos para el tratamiento o alivio de edema**

30 Prioridad:

**05.10.2007 US 978010 P**

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

**13.02.2017**

73 Titular/es:

**INDEX PHARMACEUTICALS AB (100.0%)  
Tomtebodavägen 23 A  
171 77 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**ZARGARI, AREZOU;  
AXELSSON, LARS-GÖRAN;  
SPIIK, ANN-KRISTIN y  
KOUZNETSOV, NIKOLAI**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 600 919 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos para el tratamiento o alivio de edema

5 **Campo técnico**

Esta invención y realizaciones de la misma se refieren al campo de la medicina, y en particular a compuestos novedosos y a métodos para su uso en el tratamiento o alivio de edema, un trastorno o disfunción en el equilibrio del líquido intersticial en cualquier órgano o tejido, que se encuentra en varios estados médicos.

10

**Antecedentes**

El edema puede definirse como una acumulación anómala de líquido en los intersticios de células en espacios tisulares o en cavidades corporales. Puede estar provocado o bien por un movimiento excesivo de líquido desde el sistema vascular al interior de los tejidos o bien por un movimiento inadecuado de líquido desde los tejidos de vuelta al sistema vascular. El intercambio normal de líquido entre estos dos compartimentos se regula por la "ecuación de Starling" de líquido tisular, mediante la cual la generación de líquido intersticial depende del equilibrio de presión osmótica y presión hidrostática que actúan en sentidos opuestos a través de las paredes capilares semipermeables. El edema es el resultado de un desequilibrio en estas fuerzas, que tiende a provocar acumulación anómala de líquido en los espacios intersticiales.

Las manifestaciones clínicas del edema incluyen hinchamiento de leve a intenso del cuerpo y un aumento de peso corporal. El hinchamiento puede o bien estar provocado por un aumento generalizado (o sistémico) de líquido extracelular o bien deberse a acumulaciones edematosas que se confinan en un sitio localizado. La anasarca, el estado médico para edema generalizado, está marcada por el hinchamiento de los tejidos subcutáneos, mientras que el edema localizado se denomina normalmente, basándose en el sitio afectado, hidrotórax (líquido seroso en exceso en los espacios entre la en pleura), hidropericardio (líquido en exceso en el pericardio), hidroperitoneo o ascitis (líquido en exceso en la cavidad peritoneal), entre otros.

La composición del líquido extravascular que se acumula en el edema varía según su etiología. En el caso de edema provocado por mecanismos no inflamatorios, el líquido (transudado) comprende una concentración en proteínas relativamente baja y tiene menor densidad relativa, lo que indica que el endotelio del sitio afectado es normal. En tales casos, el transudado es esencialmente un ultrafiltrado de plasma sanguíneo. Esta clase de edema no inflamatorio está provocado principalmente por alteraciones en las fuerzas hemodinámicas a través de la pared capilar y también se conoce como edema hemodinámico. Por otro lado, en el caso de edema que está provocado por una respuesta inflamatoria, el líquido extravascular (exudado) comprende una alta concentración de proteínas, células y residuos celulares y tiene una alta densidad relativa. Esto indica una alteración significativa en la permeabilidad normal de los vasos sanguíneos pequeños en la zona afectada.

El edema se produce normalmente como manifestación funcional importante de la patogénesis de diversas enfermedades, pero también puede producirse como resultado de traumatismo y lesión. Insuficiencia cardíaca, cirrosis del hígado y enfermedades renales tales como síndrome nefrótico son algunas de las enfermedades sistémicas más comunes que producen edema. Los principales mecanismos implicados en el desarrollo de edema durante la patogénesis de la enfermedad incluyen aumento de la presión hidrostática intravascular, alteración del flujo de linfa, retención inapropiada de agua y sodio renal, reducción de la presión osmótica plasmática y aumento de la permeabilidad vascular.

El aumento en la presión hidrostática en las venas da como resultado una mala reabsorción de líquidos desde el tejido, y este desequilibrio da como resultado edema. El aumento en la presión hidrostática puede o bien producirse como aumento generalizado en la presión venosa o bien afectar sólo a un sitio específico. Un aumento local en la presión hidrostática puede resultar de un flujo de salida venoso alterado, que se encuentra habitualmente en las extremidades inferiores y es consecuencia del desarrollo de trombosis obstructiva y venas varicosas. El edema resultante está localizado en las piernas y las extremidades inferiores, conocido comúnmente como edema periférico. Un aumento generalizado en la presión venosa da como resultado edema sistémico, que se observa comúnmente en el caso de insuficiencia cardíaca congestiva. Específicamente, la insuficiencia en el lado izquierdo del corazón da como resultado acumulación de líquido en los pulmones (alveolos), dando como resultado disnea y edema pulmonar. Por otro lado, durante la insuficiencia del lado derecho del corazón, se acumula líquido en las extremidades inferiores, provocando edema periférico. A medida que el estado progresa o empeora, las extremidades superiores también se hinchan y, finalmente, se produce acumulación de líquido en la cavidad peritoneal, lo cual da como resultado un estado edematoso conocido como ascitis. Se ha observado que causas del edema, que están generalizadas por todo el organismo, pueden provocar edema en múltiples órganos.

El flujo alterado de linfa o la obstrucción linfática da como resultado un drenaje inadecuado de líquido intersticial, que por consiguiente provoca linfedema localizado. El linfedema es un estado edematoso debilitante común en el que se acumula linfa en exceso en tejidos. Puede estar provocado por una obstrucción inflamatoria o neoplásica, presión por un cáncer o un ganglio linfático aumentado, destrucción de vasos linfáticos por radioterapia o infiltración del

65

sistema linfático por infecciones tales como elefantiasis o filariasis, entre otros.

La retención excesiva de sodio y agua por los riñones provoca un aumento del volumen de líquido intravascular, lo que finalmente aumenta la presión hidrostática y provoca edema. Estados tales como insuficiencia renal aguda o glomerulonefritis estreptocócica, entre otros, afectan directamente a la función renal normal y provocan retención anómala de sales en el organismo. Aparte de esto, la patogénesis de diversos trastornos tales como insuficiencia cardiaca congestiva, hipoalbuminemia, etc., activa el sistema hormonal de renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), que fomenta la retención de sodio y agua. Por tanto, el edema que se inicia mediante un mecanismo se complica por el mecanismo secundario de retención de sal y líquido. Una carga de líquido adicional en el organismo y el círculo vicioso de retención de líquido desequilibra adicionalmente el gradiente de presión a través de las membranas y da como resultado empeoramiento del edema.

La disminución de la presión osmótica plasmática dentro de los vasos facilita el movimiento de líquidos hacia los espacios intersticiales, dando como resultado edema. Tal disminución en la presión osmótica plasmática puede ser el resultado o bien de una pérdida excesiva o bien de una síntesis reducida de proteínas plasmáticas para las que es impermeable la membrana capilar, especialmente albúminas, que contribuyen principalmente a mantener el volumen sanguíneo. La causa más importante de pérdida excesiva de albúmina es un trastorno renal conocido como el síndrome nefrótico, que se caracteriza por una membrana basal glomerular con fugas, y que finalmente da como resultado edema generalizado. La síntesis reducida de proteínas séricas, especialmente albúminas (o hipoalbuminemia), se produce en enfermedades difusas del hígado, tales como cirrosis, o está asociada con la malnutrición. En todos estos casos, el movimiento de líquido desde el compartimento intravascular hasta el intersticial da como resultado una contracción del volumen de plasma, lo cual da como resultado síntomas de tipo edema generalizado tales como ascitis y edema periférico, entre otros.

Otra causa importante para la pérdida excesiva de proteínas plasmáticas es un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos frente a proteínas plasmáticas. Esta permeabilidad aumentada provoca movimiento de proteínas y células, tales como leucocitos, desde la circulación hasta el intersticio. La pérdida de líquido rico en proteínas del plasma reduce la presión osmótica intravascular y aumenta la presión osmótica del espacio intersticial, lo cual da finalmente como resultado un flujo de salida de líquido desde los vasos sanguíneos hasta el intersticio, provocando el edema. Un aumento en la permeabilidad vascular es una de las principales características de la respuesta inflamatoria del organismo frente a estímulos, especialmente en el caso de inflamación aguda. De hecho, el edema es uno de los principales signos de inflamación aguda. Durante la inflamación, los factores químicos derivados del plasma y desencadenados por estímulos inflamatorios median en varias respuestas vasculares y celulares en el sitio afectado. Estos cambios estructurales en la microvasculatura dan como resultado un aumento de la permeabilidad de la membrana de los vasos sanguíneos, provocando movimiento de células y proteínas plasmáticas, por ejemplo leucocitos desde la circulación hasta el intersticio, lo cual da como resultado en última instancia edema específico el sitio. El edema inflamatorio puede atribuirse en gran medida a la acción directa de histamina, bradichina y otras sustancias relacionadas. Los principales mecanismos del aumento de la permeabilidad vascular en la inflamación incluyen contracción de células endoteliales, retracción de la unión, lesión directa, fugas dependientes de leucocitos, regeneración del endotelio, entre otros. El aumento de la filtración de líquido hacia el intersticio se ve potenciado adicionalmente por la acción vasodilatadora arteriolar de los mediadores inflamatorios, lo cual aumenta el flujo sanguíneo, el área superficial sometida a perfusión, la presión hidrostática capilar y también facilita el edema mediante otros mecanismos.

En resumen, se conoce el edema como una de las manifestaciones funcionales importantes de la patogénesis de diversas enfermedades. La insuficiencia cardiaca, cirrosis del hígado, síndrome nefrótico, entre otros, son algunas de las enfermedades sistémicas más comunes que finalmente dan como resultado edema. Entender la dinámica del edema y las otras manifestaciones clínicas relacionadas asociadas con estas enfermedades es importante para descifrar su patología completa y también puede ayudar a desarrollar estrategias de diagnóstico, terapéuticas y preventivas novedosas y altamente específicas frente a estas enfermedades.

Un objetivo es poner a disposición compuestos y métodos novedosos para la prevención, el alivio o el tratamiento de edema. Otros objetivos y sus ventajas asociadas resultarán evidentes a partir del estudio de la descripción y los ejemplos.

Algunos compuestos oligonucleotídicos se dan a conocer en SPIIK A-K *et al.*, "Abrogated lymphocyte infiltration and lowered CD14 in dextran sulfate induced colitis in mice treated with p65 antisense oligonucleotides", INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE 2002 DE LNKD- 001:10.1 007/S00384-001-0366-3, vol. 17, n.º 4, 2002, páginas 223-232, XP002602711, ISSN: 0179-1958.

El documento WO 2007/004979 A1 del mismo solicitante (Index Pharmaceuticals AB) se refiere a la potenciación de la eficacia de esteroides en un paciente que no responde al tratamiento con esteroides que padece un estado inflamatorio que no responde o responde mal o de manera inadecuada al tratamiento antiinflamatorio, mediante la administración de una cantidad eficaz de un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-Xm-TTCGT-Yn-3' a 5 dicho paciente, en la que X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m=0-7, n=0-7 y en la que al menos un dinucleótido CG está desmetilado.

El documento US 5.968.826 da a conocer composiciones y métodos que se proporcionan para modular la expresión de integrina alfa 4. Se prefieren compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos antisentido, dirigidos a ácidos nucleicos que codifican para integrina alfa 4. También se proporcionan métodos de uso de estos compuestos para modular la expresión de integrina alfa 4 y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de integrina alfa 4.

D'ACQUISTO F *ET AL*: "Local administration of transcription factor decoy oligonucleotides to nuclear factor-kappaB prevents carrageenin-induced inflammation in rat hind paw", GENE THERAPY OCT 2000 LNKDPUBMED: 11083494, vol. 7, n.º 20, octubre de 2000 (10-2000), páginas 1731-1737, XP002602712, ISSN: 0969-7128

DATABASE EMBL [en línea], 19 de abril de 2007 (19-04-2007), "WangVSVGgfp-Jurkat-454-Avr-163695\_0092\_1182 Wang-VSVGgfpJurkat-454-Avr Homo sapiens genomic, genomic survey sequence", recuperada de EBI con el n.º de registro EM GSS:E1575951, n.º de registro de base de datos E1575951.

El documento WO 02/12894 A1 se refiere a la identificación de actividad supresora de tumor de una proteína, KLF6 (KLF6), y a composiciones y métodos de diagnóstico y terapéuticos relacionados. La solicitud de patente internacional publicada WO 02/12894 parece dar a conocer un oligonucleótido con una identidad del 82,35% con respecto a la SEQ ID NO: 6 de la presente invención.

### Sumario

Los inventores ponen a disposición un oligonucleótido según la reivindicación 1 y métodos para la prevención, el tratamiento o el alivio de edema tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Los presentes inventores encontraron sorprendentemente que un compuesto oligonucleotídico que comprende una secuencia según SEQ ID NO 6 es eficaz en el tratamiento o alivio de edema.

Según una realización de la invención, el compuesto oligonucleotídico, que comprende la secuencia SEQ ID NO 6, tiene una longitud total de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 30 bases.

Los inventores han identificado y sometido a prueba secuencias oligonucleotídicas individuales, y han mostrado su utilidad en el tratamiento o alivio de edema.

Basándose en estos hallazgos, los inventores presentan compuestos específicos tal como se da a conocer en las reivindicaciones adjuntas. Estos compuestos se han sometido a prueba tanto *in vitro* como *in vivo*, y los resultados experimentales respaldan en un principio la teoría de que los compuestos reducen el edema al reducir la permeabilidad vascular.

### Breve descripción de las figuras

A continuación se describirán realizaciones con más detalle, en la descripción, ejemplos y reivindicaciones, que deben estudiarse junto con los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 es un gráfico que muestra el efecto antiinflamatorio de fármacos de prueba y de control en un modelo de edema de oreja inducido por 13-acetato de tetradecanoilforbol (TPA). IDX0920 (50 µg), IDX0150 (100 µg), IDX0955 (100 µg) y el fármaco de prueba IDX0001 (100 µg) administrados como una única inyección s.c. 20 minutos antes de la administración de TPA. Se establece el grosor inicial de las orejas como el 100%. La reducción del área bajo la curva (AUC) en comparación con PBS es para IDX0920 del -22,1% (P<0,011), IDX0150 del -38,9% (P<0,011), IDX0955 del -4,8% e IDX0001 del -15,7% (P>0,05). ANOVA de un factor con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

La figura 2 muestra resultados del modelo de edema de oreja inducido por TPA que muestra el valor máximo inflamatorio promedio de hinchamiento tras la administración de 100 µg de IDX0150 combinado a partir de 10 experimentos con el modelo de TPA en comparación con control negativo (vehículo de PBS con TPA). Prueba de la t de Student, \*\*\*P <0,001, ± DE.

La figura 3a es un histograma combinado a partir del modelo de edema de oreja inducido por TPA. Reducción del valor máximo de edema mediante el tratamiento con IDX0150, en comparación con tratamiento con vehículo (PBS). Barras negras, administración intranasal (i.n.), barra blanca, administración intraperitoneal (i.p.) y barras con sombreado, administración subcutánea (s.c.).

Tratamiento con IDX0150 a: -4 días antes de la administración de TPA (I, E y F), -2 días antes de la administración de TPA (D), -20 min antes de la administración de TPA (H, A, B y C), +2 h tras la administración de TPA (J y G). En todos los casos, se usaron 100 µg de IDX0150/ratón para el tratamiento, excepto por el estudio F en el que se usaron 50 µg de IDX0150/ratón. E,F o B,C son la media de dos experimentos.

La figura 3b es un histograma combinado a partir del modelo de edema de oreja inducido por TPA. Reducción del área bajo la curva (AUC) de edema mediante tratamiento con IDX0150, en comparación con tratamiento con vehículo (PBS). Barras negras, administración intranasal (i.n.), barra blanca, administración intraperitoneal (i.p.) y barras con sombreado, administración subcutánea (s.c.). Tratamiento con IDX0150 a: -4 días antes de la administración de TPA (I, E y F), -2 días antes de la administración de TPA (D), -20 min antes de la administración de TPA (H, A, B y C), +2 h tras la administración de TPA (J y G). En todos los casos se usaron 100 µg de IDX0150/ratón para el tratamiento, excepto por el estudio F en el que se usaron 50 µg de IDX0150/ratón. E, F o B, C son la media de dos experimentos.

La figura 4 es un histograma que muestra el efecto de fenidona e IDX0150 en el modelo de edema de oreja inducido por ácido araquidónico (AA). Fenidona, administrada 30 min antes de la inducción por AA, mostró una reducción del AUC de -39,1%,  $P < 0,05$ , que era similar al tratamiento con IDX0150 obtenido anteriormente (véase la figura 2). Fenidona administrada 30 min antes que AA, en combinación con IDX0150 administrado 20 min antes que AA, dio como resultado una reducción adicional (-76,8%,  $P < 0,001$ ).

La figura 5a es un gráfico que muestra el efecto antiinflamatorio de fármacos de prueba y vehículo (PBS) en un modelo de edema de oreja inducido por TPA. Se administraron diez µg de IDX9024, IDX9025, IDX9038, IDX9051 e IDX9053 como una única inyección s.c. 20 minutos antes de la administración de TPA. Se establece el grosor inicial de las orejas como el 100%. Reducción del AUC para IDX9024 del -47,3%, IDX9025 del -57,8%, IDX9038 del -47,4%, IDX9051 del -54,0% e IDX9053 del -39,0% en comparación con el control de PBS.

La figura 5b es un gráfico que muestra el efecto antiinflamatorio de fármacos de prueba y vehículo (PBS) en un modelo de edema de oreja inducido por TPA. Se administraron diez µg de IDX9064, IDX9076, IDX9078, IDX9080 e IDX9089 como una única inyección s.c. 20 minutos antes de la administración de TPA. Se establece el grosor inicial de las orejas como el 100%. Reducción del AUC para IDX9064 del -59,7%, IDX9076 del -5,1%, IDX9078 del -41,3%, IDX9087 del -40,2% en comparación con el control de PBS.

La figura 5c es un gráfico que muestra el efecto antiinflamatorio de fármacos de prueba y vehículo (PBS) en un modelo de edema de oreja inducido por AA. Se administraron diez µg de IDX9024, IDX9025 e IDX9051 como una única inyección s.c. 20 minutos antes de la administración de AA. Se establece el grosor inicial de las orejas como el 100%. Reducción del AUC para IDX9024 del -58,5%, IDX9025 del -81,9% e IDX9051 del -67,5% en comparación con el control de PBS.

La figura 5d es un gráfico que muestra el efecto antiinflamatorio de fármacos de prueba y vehículo (PBS) en un modelo de edema de oreja inducido por AA. Se administraron diez µg de IDX9076, IDX9078 e IDX0150 como una única inyección s.c. 20 minutos antes de la administración de AA. Se establece el grosor inicial de las orejas como el 100%. Reducción del AUC para IDX9076 del -45,7%, IDX9078 del -79,4% e IDX0150 del -89,4 % en comparación con el control de PBS.

La figura 6 muestra los protocolos profiláctico y terapéutico para el modelo murino de inflamación alérgica de las vías respiratorias inducida por ovalbúmina (OVA).

La figura 7 es un histograma combinado que muestra el número total de tipos de células diferentes en líquido de lavado alveolar bronquial (BAL) de ratones Balb/c inmunizados con OVA, 48 h tras el último aerosol de OVA. Se trataron los ratones con IDX0150 (50 µg/animal) administrado mediante instilación intranasal en el día 16 y 21 en un protocolo profiláctico (IDX0150, véase M y M). En un protocolo terapéutico, se administró IDX0150 en el día 30 y 33 (IDX0150 A, véase M y M), o en el día 30 y 34 (IDX0150 B). Las instilaciones en los protocolos terapéuticos (A y B) en el día 30 y 33 se administraron 4 h tras la exposición a aerosol. La segunda instilación en el protocolo B, en el día 34, se administró 24 h tras la última exposición a aerosol. Se trataron controles sanos con PBS y se expusieron a aerosol de OVA. Datos mostrados como media  $\pm$  DE. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  usando análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, corrección a posteriori de Dunnett. El grupo de PBS se sometió a tratamiento simulado con PBS y se expuso a aerosol de OVA.

La figura 8 es un histograma combinado que muestra los resultados de un protocolo profiláctico en el modelo de asma alérgico inducido por OVA. El número total de células en líquido de lavado alveolar bronquial (BAL) de ratones Balb/c inmunizados con OVA, 48 h tras el último aerosol de OVA (primero en el día 0 y último en el día 12). Se trataron los ratones con IDX9025, IDX9038 o IDX9053 (50 µg/animal) administrados como instilación intranasal en el día 16 y 21 tras la primera inmunización. El grupo de PBS se inmunizó y se sometió a tratamiento simulado con PBS y se expuso a aerosol de OVA. Datos mostrados como media  $\pm$  DE. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  usando análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, corrección a posteriori de Dunnett.

La figura 9a es un histograma que muestra el resultado del tratamiento intraperitoneal con 50 µg de IDX0150/ratón, administrados 20 min antes de la inducción de pleuresía inducida por tioglicolato. El número de células polimorfonucleares (PMN) en exudados pleurales mostró una reducción del 40,9% tras el tratamiento con IDX0150

en comparación con ratones con inflamación (PBS). Datos mostrados como media  $\pm$  DE.

La figura 9b es un histograma que muestra el resultado del tratamiento intraperitoneal con 50  $\mu$ g de IDX0150/ratón, administrados 20 min antes de la inducción de pleuresia inducida por tioglicolato. IDX0150 mostró una reducción en el volumen de aclaramiento del edema pleural con el 69,2% en comparación con el tratamiento con tioglicolato. Datos mostrados como media  $\pm$  DE.

### Descripción detallada

Antes de describir las realizaciones, debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento se usa únicamente con el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitativa, ya que el alcance de las realizaciones se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

Debe indicarse que, tal como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos "alivio", "tratamiento", "prevención", "terapia", "uso terapéutico", "uso profiláctico", "medicamento" y "uso médico" cuando se usan en la descripción y las reivindicaciones abarcan tanto aplicaciones en seres humanos como en animales o veterinarias. Resulta importante que el término "tratamiento" se usa en el presente documento en su sentido más amplio, sin limitarse a revertir o curar una enfermedad, sino que también incluye el alivio de los síntomas o el retraso de la progresión de la enfermedad.

Además, cuando se usa el término "método de tratamiento" también se abarcan etapas de método y métodos auxiliares, es decir, casos en los que los métodos dados a conocer como tales no constituyen el método exhaustivo. Se contempla que los métodos de la invención pueden constituir una etapa en una serie de acciones y medidas, que conducen al alivio, la prevención o el tratamiento de una enfermedad.

El término "aproximadamente" cuando se usa en el contexto de valores numéricos indica un intervalo de precisión, con el que está familiarizado, y resulta aceptable para, un experto en la técnica relevante. Dicho intervalo puede ser de +/-10% o preferiblemente +/- 5%.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente para inhibir o reducir el edema en cierto grado beneficioso, preferiblemente hasta en al menos el aproximadamente 10%, más preferiblemente en al menos el 20% e incluso más preferiblemente en al menos el 30% o más, medido como reducción del valor máximo, u otra medida relevante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Preferiblemente, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un vertebrado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "portador" abarca cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizador, solubilizador, lípido u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del portador, excipiente o diluyente dependerán de la vía de administración para una aplicación particular. Los ejemplos de portadores particularmente adecuados para administración mucosa incluyen, pero no se limitan a, solución salina, liposomas, tensioactivos, compuestos mucoadhesivos, inhibidores enzimáticos, sales biliares, potenciadores de la absorción y ciclodextrinas. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

Para los fines de esta descripción, el término "inmunomodulador" se refiere a las propiedades de un compuesto, por ejemplo un oligonucleótido tal como se define en la presente descripción y reivindicaciones, para inducir una respuesta inmunitaria o bien estimulando el sistema inmunitario o bien reprimiendo el sistema inmunitario o bien ambas en un organismo cuando se administra a un vertebrado, tal como un mamífero. Tal como se usa en el presente documento, el término "mamífero" incluye, sin limitación ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado, vacas, cerdos, conejos, primates no humanos y seres humanos.

Para los fines de esta descripción, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleósido formado a partir de una pluralidad de unidades de nucleósido individuales unidas. Tales oligonucleótidos pueden obtenerse a partir de fuentes de ácido nucleico existentes, incluyendo ADN genómico o ADNc, pero preferiblemente se producen mediante métodos de síntesis. Los residuos de nucleósido pueden acoplarse entre sí mediante cualquiera de las numerosas uniones internucleosídicas conocidas. Tales uniones internucleosídicas incluyen, sin limitación, el enlace de fosfodiéster internucleosídico natural o de hecho internucleosídicos modificados tales como, pero sin limitarse a, fosforotioato, fosforoditioato, alquifosfonato, alquifosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxilo, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato en puente, metilfosfonato en puente, fosforotioato en puente y uniones internucleosídicas de sulfona. El término "oligonucleótido" también abarca

polinucleósidos que tienen una o más uniones internucleosídicas estereoespecíficas (por ejemplo, uniones (Rp) o (Sp)-fosforotioato, alquifosfonato o fosfotriéster). Tal como se usa en el presente documento, se pretende expresamente que los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" incluyan polinucleósidos y dinucleósidos que tienen cualquiera de tales uniones internucleosídicas, tanto si la unión comprende un grupo fosfato como si no. En determinadas realizaciones preferidas, estas uniones internucleosídicas pueden ser uniones de fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato, o combinaciones de las mismas.

El término "oligonucleótido" también abarca polinucleósidos que tienen sustituyentes adicionales incluyendo, sin limitación, grupos proteicos, grupos lipófilos, agentes de intercalación, diaminas, ácido fólico, colesterol y adamantano. El término "oligonucleótido" también abarca cualquier otro polímero que contiene nucleobases, incluyendo, sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos con esqueleto de morfolino y oligonucleótidos que tienen secciones del esqueleto con grupos de unión alquilo o grupos de unión amino.

El término "administración mucosa" incluye la administración a cualquiera de los tipos de mucosa en el cuerpo animal, por ejemplo, pero sin limitarse a, mucosa nasal, bucal, esofágica, gástrica, intestinal, olfatoria, oral, bronquial y urogenital.

Los diferentes ejemplos ponen a disposición compuestos oligonucleotídicos aislados y sustancialmente purificados que comprenden una secuencia elegida de las secuencias SEQ ID NO 1-10. En las tablas 1 y 2 a continuación se presentan secuencias específicas. Se indica que las secuencias de la tabla 1, SEQ ID NO 1 – 7, comparten la siguiente secuencia o motivo: 5'-TCGTC-3'

Se considera que compuestos según diversas realizaciones de la invención, que comprenden las secuencias, tienen preferiblemente una longitud total de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 30 bases.

Tabla 1. Ejemplos de secuencias oligonucleotídicas

Tabla 1

| SEQ ID NO | IDX, n.º | Sec. 5'-3'                      |
|-----------|----------|---------------------------------|
| 1         | IDX9024  | T*G*C*CATTTCGTCGTTCTCGTC*G*T*T  |
| 2         | IDX9025  | T*G*C*CATTTCGTCGATTTTCGTC*G*A*T |
| 3         | IDX9038  | T*C*G*TCGTTTCGGCCGATCG*T*C*C    |
| 4         | IDX9053  | G*G*G*TCGTCTG*C*G*G             |
| 5         | IDX9076  | T*C*C*CAAGATCGTCC*A*G*G         |
| 6         | IDX9078  | T*C*C*GATCGTCC*A*G*G            |
| 7         | IDX9087  | T*C*G*TCTGCTTAGTTCGTTA*G*T*T    |

\* = modificación de fosforotioato

Tabla 2. Ejemplos de secuencias oligonucleotídicas

Tabla 2

| SEQ ID NO | IDX, n.º | Sec. 5'-3'                     |
|-----------|----------|--------------------------------|
| 8         | IDX0001  | T*C*C*GCGTTCGGCCTCCTGGCG*C*G*G |
| 9         | IDX9051  | G*G*G*GCGTCTGCC*G*G*G          |
| 10        | IDX9064  | T*C*C*ATGGTCAGGGTCCC*G*G*G     |

\* = modificación de fosforotioato

Los inventores también usaron diferentes secuencias oligonucleotídicas como controles positivos y negativos. Estas se indican en la tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de oligonucleótidos usados como controles

Tabla 3

| SEQ ID NO | IDX, n.º | Sec. 5'-3'                            |
|-----------|----------|---------------------------------------|
| 11        | IDX0150  | G*G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G*C             |
| 12        | IDX0500  | G*G*A*A*C*A*G*T*T*C*G*T*C*A*T*G*G*C   |
| 13        | IDX0526  | G*G*A*ACAGTTGCTCCAT*G*G*C             |
| 14        | IDX0920  | T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*T*G*A*C*G*T*T |
| 15        | IDX0955  | G*G*G*GAACAGTTCGTCCAT*G*G*C           |

\* = modificación de fosforotioato

5 Según una realización de la invención, el oligonucleótido puede estar químicamente modificado. Esta modificación química es por ejemplo una modificación en el esqueleto de fosfato de al menos un nucleótido. Preferiblemente, la modificación en el esqueleto de fosfato es una modificación de fosforotioato o fosforoditioato.

10 Otras realizaciones ponen a disposición composiciones farmacéuticas que comprenden el oligonucleótido que comprende una secuencia según SEQ ID NO 6. Tales composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente además un excipiente o portador farmacológicamente compatible y fisiológicamente aceptable.

15 Según una realización de la invención, una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido tal como se definió anteriormente comprende además un excipiente o portador farmacológicamente compatible y fisiológicamente aceptable elegido de solución salina, liposomas, tensioactivos, compuestos mucoadhesivos, inhibidores enzimáticos, sales biliares, potenciadores de la absorción, ciclodextrinas, etc. Un experto elegirá fácilmente el excipiente o portador necesario sin necesidad de un esfuerzo inventivo.

20 Una realización actualmente preferida se refiere a una formulación farmacéutica para su administración mucosa, que comprende un oligonucleótido según SEQ ID NO 6. Las realizaciones de la invención también se refieren al uso de un oligonucleótido según SEQ ID NO 6, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, el tratamiento y/o el alivio de edema.

25 Este uso según una realización de la invención se centra preferiblemente en la prevención, el tratamiento y/o el alivio de un estado o trastorno que implica edema, en el que el edema se define como un trastorno o disfunción en el equilibrio del líquido intersticial en cualquier órgano o tejido, asociado con un estado elegido, por ejemplo, de insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática, enfermedades renales tales como síndrome nefrótico, malnutrición, cáncer, asma, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), isquemia, traumatismo y choque séptico.

30 En tal uso según realizaciones de la invención, dicho oligonucleótido se administra en una cantidad fisiológicamente aceptable y terapéuticamente eficaz, es decir una cantidad eficaz para lograr uno de regulación de la permeabilidad vascular, inhibición o reducción de la migración de leucocitos, inhibición o reducción de la migración o activación de neutrófilos, inhibición o reducción de la migración de eosinófilos e inhibición o reducción de la migración de linfocitos.

35 Según una realización de la invención, el oligonucleótido es SEQ ID NO 6, y se usa para tratar asma mediante inhibición o reducción de la migración o activación de neutrófilos.

40 Las realizaciones de la invención también ponen a disposición métodos para la prevención, el tratamiento y/o el alivio de edema, en los que el oligonucleótido de SEQ ID NO 6 se administra en una dosis eficaz para lograr uno o varios de modificación de permeabilidad vascular, inhibición de la migración y/o activación de neutrófilos, inhibición o reducción de la migración de eosinófilos, inhibición o reducción de la migración de leucocitos e inhibición o reducción de la migración de linfocitos.

45 En términos generales, las realizaciones de la invención ponen a disposición métodos para la prevención, el tratamiento y/o el alivio de edema, en los que una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido según SEQ ID NO 6 se administra a un paciente. Se eligen vías de administración adecuadas de la administración mucosa, administración transdérmica, administración subcutánea y administración intraperitoneal.

50 Según una realización, la administración mucosa se elige de administración gástrica, administración nasal, inhalación, administración ocular, administración rectal, administración urogenital y vaginal.

55 Basándose en los efectos significativos anti-hinchamiento y anti-edema registrados en los experimentos con animales realizados por los inventores, los métodos de prevención, tratamiento y/o alivio de edema pueden extenderse a cualquier enfermedad o estado en el que el edema es un componente, tal como una enfermedad o un estado elegido de insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática, enfermedades renales tales como síndrome nefrótico, malnutrición, cáncer, asma, rinitis alérgica, EPOC, lesión pulmonar aguda, estados que implican la acumulación de exudado en el pulmón o los pulmones, isquemia, traumatismo y choque séptico.

60 Entre los estados que implican la acumulación de exudado en el pulmón, pueden mencionarse los siguientes estados: efusión plural de diferente etiología, infecciones de las vías respiratorias inferiores, neumonía, infecciones bacterianas agudas del pulmón, tuberculosis, enfermedades pulmonares ocupacionales, principalmente pneumoconiosis (enfermedades pulmonares fibróticas, crónicas, provocadas por la inhalación de polvo inorgánico y material particulado, por ejemplo asbestosis, silicosis) y neumonitis por hipersensibilidad (enfermedad pulmonar alérgica, tal como una inflamación resultante de la inhalación de polvos orgánicos, por ejemplo pulmón del granjero), daño pulmonar resultante de la exposición a radiactividad, etc.

65 En un método según una realización de la invención, el oligonucleótido se administra en una cantidad de

aproximadamente 5 a aproximadamente 500 µg por kg de peso corporal, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10 a 100 µg por kg de peso corporal.

5 Otras realizaciones ponen a disposición métodos en los que el oligonucleótido se administra de manera profiláctica, por ejemplo antes de un procedimiento quirúrgico invasivo, radioterapia, tratamiento hormonal, cirugía de injerto y trasplante. El experimento con animales muestra que los compuestos también tienen un efecto pronunciado cuando se administran antes de la inducción del edema.

10 Los inventores también ponen a disposición un método en el que el oligonucleótido se administra de manera profiláctica, antes de una exposición prevista a un irritante o un alérgeno. Por tanto, los compuestos según realizaciones de la invención pueden usarse para aliviar o prevenir alergias estacionales, o bien solos o bien en combinación con otros productos farmacéuticos usados de manera convencional.

15 Otra realización es un método en el que el oligonucleótido se administra en combinación con medicación antiinflamatoria, por ejemplo medicación con esteroides.

Otra realización es un método en el que el oligonucleótido se administra en combinación con un fármaco diurético.

20 De manera interesante, se contempla que el efecto anti-hinchamiento o anti-edema logrado con los compuestos actualmente sometidos a prueba también puede observarse cuando se administran otros compuestos inmunomoduladores, variaciones estructurales de los mismos, tales como oligonucleótidos ramificados, constructos oligonucleotídicos con forma de pesas, constructos oligonucleotídicos unidos a glicina y similares, que comprenden las secuencias presentadas en las tablas 1 y 2.

25 Sin embargo, sin desear limitarse a ninguna teoría específica, los presentes inventores creen que los oligonucleótidos basados en ADN en el presente documento muestran una especificidad superior, eficacia mejorada frente al hinchamiento o edema, y están mejor adaptados para su uso clínico en seres humanos debido a sus secuencias específicas.

### 30 **Ejemplos**

#### 1. Efectos sobre edema de oreja murino inducido por acetato de forbol (13-acetato de tetradecanoilforbol, TPA) o ácido araquidónico (AA) de compuestos oligonucleotídicos experimentales administrados mediante diferentes esquemas de administración

35 Materiales y métodos

#### Productos químicos

40 Se almacenó 13-acetate de tetradecanoilforbol (TPA), CAS 16561-29-8, pureza de aproximadamente el 99% mediante CCF (Sigma-Aldrich Sweden AB, Estocolmo, Suecia) como un polvo liofilizado. Dimetilsulfóxido (DMSO), CAS 67-68-5, esterilizado por filtración, Hybri-Max® (Sigma-Aldrich Sweden AB, Estocolmo, Suecia). Acetona, calidad analítica, CAS 67-64-1, Labora AB, Sollentuna, Suecia.

45 Se preparó una disolución madre de TPA disolviendo TPA en DMSO, 1 mg/ml, y se almacenó congelada a -80°C. Para el estudio B-E, se preparó una disolución de trabajo con 200 µl de la disolución madre de TPA añadidos a 800 µl de acetona. La disolución de trabajo se usó el mismo día que se preparó.

50 Ácido araquidónico (AA), CAS 506-32-1, lote 106K1432, aceite, pureza de aproximadamente el 99% mediante CCF (Sigma-Aldrich Sweden AB, Estocolmo, Suecia). Acetona, calidad analítica, CAS 67-64-1, Labora AB, Sollentuna, Suecia.

55 Se preparó una disolución madre de AA diluyendo AA en acetona, 4 mg/10 µl, y se almacenó congelada a -80°C. Se preparó una disolución de trabajo final, 1 mg/10 µl, en acetona. La disolución de trabajo se usó en el plazo de una hora tras la preparación.

#### Compuestos de prueba

60 En total, se sometieron a prueba 15 compuestos en los experimentos de TPA y/o AA, véase la tabla 1-3. Los oligonucleótidos se sintetizaron por biomers.net GmbH, Ulm, Alemania, y se almacenaron congelados a -20°C.

#### *Formulación*

65 Se diluyeron los compuestos hasta la concentración de trabajo con PBS (Fluka, Sigma) a temperatura ambiente. Se ajustó la concentración con ayuda de espectrofotometría UV (SmartSpec® 3000, BIO-RAD, Hercules, EE.UU.) hasta

una precisión del 95%.

Experimentos con animales y dosificación

5 *Animales*

10 Ratonos SPF NMRI/KS machos y hembras (animales para reproducción propios de InDex Pharmaceutical AB de ratones SPF NMRI, MTC, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia) o ratones BALB/cJ hembras (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EE.UU.). Se agruparon los animales y se aclimataron durante al menos una semana antes de entrar en el experimento.

*Alojamiento*

15 Se mantuvieron los animales en salas a 21°C, ± 3°C, y con una humedad relativa del 55% ± 15%. El sistema de ventilación se diseñó para proporcionar 10 cambios de aire por hora. Se iluminó la sala para proporcionar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La luz se proporcionó desde las 06:00 hasta las 18:00 horas.

20 Se mantuvieron los ratones en jaulas de policarbonato transparente (Macrolone tipo III) (área de suelo: 810 cm<sup>2</sup>), 8 en cada jaula.

*Lecho*

El lecho de la jaulas era lecho Beekay (B&K, Sollentuna, Suecia).

25 *Mejora del entorno*

Para la mejora del entorno, a los animales se les proporcionó un suministro de Sizzle Nest o Happy-Mat, (Scanbur A.S, Lellingner, Dinamarca).

30 *Dieta*

Se suministró una dieta para roedores de pienso completa, R36 (Laktamin AB, Estocolmo, Suecia) a voluntad.

*Agua potable*

35 Los animales tenían libre acceso a botellas para beber para animales con agua potable de calidad doméstica.

*Identificación, agrupamiento y tratamiento de animales*

40 Cada jaula se identificó mediante una tarjeta de jaula marcada con un número de estudio, número de grupo, número de aprobación del comité ético, sexo y números de orejas de animales. Se marcaron individualmente los animales en la cola con líneas transversales correspondientes al número de animal, usando un rotulador de tinta permanente. En la tabla 4 se resume una ilustración de los protocolos usados para los diferentes tratamientos. Los compuestos se sometieron a prueba según los mismos protocolos con modificaciones necesarias.

45

Tabla 4. Ejemplos de protocolos usados en los experimentos

Tabla 4

| Estudio A |   | TPA                      |     |        |
|-----------|---|--------------------------|-----|--------|
| Grupo     | n | inyección i.p.           | Día | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | 0   | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | 0   | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | 0   | 100 µg |
| 4         | 4 | IDX0955                  | 0   | 100 µg |
| 5         | 4 | IDX0001                  | 0   | 100 µg |
| Estudio B |   | TPA                      |     |        |
| Grupo     | n | Una única inyección s.c. | Día | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | -4  | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | -4  | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | -4  | 100 µg |
| 4         | 4 | IDX0955                  | -4  | 100 µg |
| 5         | 4 | IDX0001                  | -4  | 100 µg |

ES 2 600 919 T3

|           |   |                          |            |        |
|-----------|---|--------------------------|------------|--------|
| Estudio C |   | TPA                      |            |        |
| Grupo     | n | Una única inyección s.c. | Día        | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | -4         | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | -4         | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | -4         | 100 µg |
| 4         | 4 | IDX0955                  | -4         | 100 µg |
| 5         | 4 | IDX0001                  | -4         | 100 µg |
| Estudio D |   | TPA                      |            |        |
| Grupo     | n | Una única inyección s.c. | Día        | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | -2         | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | -2         | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | -2         | 100 µg |
| 4         | 4 | IDX0955                  | -2         | 100 µg |
| 5         | 4 | IDX0001                  | -2         | 100 µg |
| Estudio E |   | TPA                      |            |        |
| Grupo     | n | Una única inyección s.c. | Día        | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | 0          | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | 0          | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | 0          | 100 µg |
| 4         | 4 | IDX0955                  | 0          | 100 µg |
| 5         | 4 | IDX0001                  | 0          | 100 µg |
| Estudio F |   | TPA                      |            |        |
| Grupo     | n | Una única inyección s.c. | Día        | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | 0          | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | 0          | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | 0          | 50 µg  |
| 4         | 4 | IDX0955                  | 0          | 50 µg  |
| 5         | 4 | IDX0001                  | 0          | 50 µg  |
| Estudio G |   | TPA                      |            |        |
| Grupo     | n | Una única inyección s.c. | Día        | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | 0,+2 h     | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | 0,+2 h     | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | 0,+2 h     | 100 µg |
| 4         | 4 | IDX0955                  | 0,+2 h     | 100 µg |
| 5         | 4 | IDX0001                  | 0,+2 h     | 100 µg |
| Estudio H |   | TPA                      |            |        |
| Grupo     | n | Una única inyección i.n. | Día        | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | -4         | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | -4         | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | -4         | 100 µg |
| 4         | 4 | IDX0955                  | -4         | 100 µg |
| 5         | 4 | IDX0001                  | -4         | 100 µg |
| Estudio I |   | TPA                      |            |        |
| Grupo     | n | Una única inyección i.n. | Día        | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | 0          | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | 0          | 50 µg  |
| 3         | 4 | IDX0150                  | 0          | 100 µg |
| 4         | 4 | IDX0955                  | 0          | 100 µg |
| 5         | 4 | IDX0001                  | 0          | 100 µg |
| Estudio J |   | TPA                      |            |        |
| Grupo     | n | Una única inyección i.n. | Día        | Dosis  |
| 1         | 4 | PBS, control             | 0,+2 horas | -      |
| 2         | 4 | IDX0920                  | 0,+2 horas | 50 µg  |

## ES 2 600 919 T3

|                  |   |                          |            |          |
|------------------|---|--------------------------|------------|----------|
| 3                | 4 | IDX0150                  | 0,+2 horas | 100 µg   |
| 4                | 4 | IDX0955                  | 0,+2 horas | 100 µg   |
| 5                | 4 | IDX0001                  | 0,+2 horas | 100 µg   |
| <b>Estudio K</b> |   |                          |            |          |
|                  |   | TPA                      |            |          |
| Grupo            | n | Una única inyección s.c. | Día        | Dosis    |
| 1                | 4 | PBS, control             | 0          | -        |
| 2                | 4 | IDX0150                  | 0          | 0,1 µg   |
| 3                | 4 | IDX0150                  | 0          | 1 µg     |
| 4                | 4 | IDX0150                  | 0          | 10 µg    |
| 5                | 4 | IDX0150                  | 0          | 100 µg   |
| <b>Estudio L</b> |   |                          |            |          |
|                  |   | TPA                      |            |          |
| Grupo            | n | Una única inyección i.n. | Día        | Dosis    |
| 1                | 4 | PBS, control             | 0          | -        |
| 2                | 4 | IDX0526                  | 0          | 0,1 µg   |
| 3                | 4 | IDX0526                  | 0          | 1 µg     |
| 4                | 4 | IDX0526                  | 0          | 10 µg    |
| 5                | 4 | IDX0526                  | 0          | 100 µg   |
| <b>Estudio M</b> |   |                          |            |          |
|                  |   | TPA                      |            |          |
| Grupo            | n | Una única inyección i.n. | Día        | Dosis    |
| 1                | 4 | PBS, control             | 0          | -        |
| 2                | 4 | IDX0500                  | 0          | 0,1 µg   |
| 3                | 4 | IDX0500                  | 0          | 1 µg     |
| 4                | 4 | IDX0500                  | 0          | 10 µg    |
| 5                | 4 | IDX0500                  | 0          | 100 µg   |
| <b>Estudio N</b> |   |                          |            |          |
|                  |   | TPA                      |            |          |
| Grupo            | n | Una única inyección i.n. | Día        | Dosis    |
| 1                | 4 | PBS, control             | 0          | -        |
| 2                | 4 | IDX0500                  | 0          | 0,005 µg |
| 3                | 4 | IDX0500                  | 0          | 0,01 µg  |
| 4                | 4 | IDX0500                  | 0          | 0,1 µg   |
| 5                | 4 | IDX0500                  | 0          | 1 µg     |
| <b>Estudio O</b> |   |                          |            |          |
|                  |   | TPA                      |            |          |
| Grupo            | n | Una única inyección i.n. | Día        | Dosis    |
| 1                | 4 | PBS, control             | 0          | -        |
| 2                | 4 | IDX0500                  | 0          | 10 µg    |
| 3                | 4 | IDX0500                  | 0          | 100 µg   |
| 4                | 4 | IDX0150                  | 0          | 10 µg    |
| 5                | 4 | IDX0150                  | 0          | 100 µg   |

### Procedimiento de prueba

#### *Administración de dosis*

5 Se realizaron inyecciones intraperitoneales (i.p.) administrando 100 µl en el cuadrante inferior derecho del abdomen. Se realizaron inyecciones subcutáneas con 100 µl en la región del cuello. Se realizó la administración intranasal dejando que el ratón inhalara gotitas en los orificios nasales, con un volumen total de 40 µl. Todas las administraciones se realizaron con ratones no anestesiados.

10 *Inducción del edema*

15 Se lavaron ambas oídos externos de un ratón no anestesiado con jabón suave (Palmolive, Suecia) usando un cepillo de dientes suave, se secaron las orejas con tejido y se limpiaron con tejido empapado con acetona. Tras dejar que se evaporara la acetona, se aplicó TPA o AA en ambos lados, 10 µl, en cada lado de la oreja con cuidado de cubrir toda la oreja. Se sujetó al ratón durante 20 segundos para permitir que el disolvente se evaporara.

#### *Tratamiento farmacológico*

Se administraron inyecciones intraperitoneales en el cuadrante inferior derecho del abdomen con el animal sujeto en una posición en decúbito supino. Se administraron inyecciones subcutáneas (s.c.) en el cuello de los animales. Se administraron administraciones intranasales a ratones sujetos en una posición ligeramente reclinada. Con una micropipeta ajustable, se administraron 40 µl de la sustancia de prueba en gotitas en los orificios nasales y se dejó que el ratón aspirara por voluntad propia.

#### *Signos clínicos*

Se observó diariamente cada ratón hasta que se sacrificó. Se registraron todos los signos de enfermedad, salud y cualquier cambio en el comportamiento.

#### *Parámetros clínicos*

Se midieron las orejas de ratones no anestesiados en diferentes puntos de tiempo durante hasta 96 horas tras administrarse el TPA, o hasta 24 horas para el modelo de AA. Las primeras mediciones se realizaron antes de inducirse el edema. Se registró el grosor con un micrómetro de esfera cargado con resorte (Limit, calibre de grosor, precisión de 0,01 mm, área de contacto de Ø 6 mm, Luna AB, Allingsås, Suecia) por triplicado en todos los puntos de tiempo por oreja.

Se calculó el grosor promedio para ambas orejas en un ratón y se comparó con el grosor promedio de las orejas en el punto de tiempo de partida. Se estableció el valor obtenido al comienzo del experimento como el 100%. Se calcularon los valores máximos y los valores del área bajo la curva (AUC) para los grupos de tratamiento y se compararon con el grupo de control con inflamación, tratado con PBS (establecido al 100%), y se expresó como cambio en porcentaje ( $\Delta$  de % de AUC).

#### *Datos estadísticos*

Se usó la prueba de la t de Student para calcular la significación estadística (funciones estadísticas de Excel, Microsoft® Excel 2002, Microsoft Corp., Redmond, EE.UU.).

Se calculó el área bajo la curva (AUC) con la línea de base fijada a 100 usando GraphPad Prism versión 4.03 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

#### *Resultados*

El protocolo del experimento se ilustra por los ejemplos facilitados en la tabla 4. Se calculó la reducción del AUC y los valores de P con respecto al control positivo (TPA o AA + PBS).

#### *Estudio A*

Este estudio mostró una reducción del edema cuando se administraron los compuestos de la invención por vía i.p., comenzándose la inducción del edema en el día 0. En este experimento la sustancia de control, IDX0150, mostró una remisión casi completa de la inflamación y redujo el AUC en un -38,9%.

#### *Estudio B*

El estudio B investigó el efecto profiláctico de los compuestos cuando se administraron por vía s.c. 4 días antes de la inducción del edema. IDX0920, IDX0955 e IDX0001 mostraron una reducción del AUC con el -19,3%, -22,7% y -16,3% respectivamente, sin embargo no fueron estadísticamente significativos (NS). IDX0150 no mostró ninguna reducción del AUC. A causa del mal desenlace debido a la gran variación entre mediciones, este estudio se repitió (estudio C).

#### *Estudio C*

En un estudio repetido del estudio B, los ODN administrados por vía s.c. 4 días antes de la inducción del edema, mostraron una reducción del AUC con el -3%, -22%, -24,3% y -17,9% respectivamente, estadísticamente significativo para IDX0150 (P <0,01), IDX0955 (P <0,01) e IDX0001 (P <0,05).

#### *Estudio D*

En un régimen profiláctico más corto, administrado por vía s.c., 2 días antes de la inducción del edema, se obtuvieron resultados casi similares a los del estudio C. Estadísticamente significativo para IDX0920, IDX0150, IDX0955 (P <0,01) y no significativo para IDX0001. La reducción del AUC fue del -19,1%, -16,5%, -17,8% y -12,4% respectivamente.

#### *Estudio E*

5 En este estudio los compuestos se administraron en el mismo día que se indujo el edema. La inducción fue escalonada para permitir aproximadamente 20 minutos de tiempo de espera para cada ratón. En este estudio hubo una reducción relativamente uniforme del AUC, IDX0920 del -19,4%, IDX0150 del -27,3%, IDX0955 del -17,7% e IDX0001 del -16,7%. Todos los compuestos dieron como resultado una reducción estadísticamente significativa (P <0,01).

#### Estudio F

10 En este estudio, los compuestos se administraron en el mismo día que se indujo el hinchamiento, a dosis iguales (50 µg) a cada animal. Esto también dio como resultado una reducción del AUC, IDX0920 del -17%, IDX0150 del -31,1%, IDX0955 del -18,3% e IDX0001 del -13,2%. Excepto por IDX0920 que mostró una pendiente descendente retrasada, todos los demás compuestos mostraron una reducción significativa del hinchamiento, IDX0150 e IDX0955 con P <0,01 e IDX0001, con P <0,05.

#### 15 Estudio G

20 Para investigar un régimen terapéutico, los compuestos se administraron 2 horas tras la inducción del edema. Esto dio como resultado una reducción significativa del AUC en IDX0920 del -43,8% (P <0,01), IDX0150 del -42,3% (P <0,01) e IDX0955 del -40,7% (P <0,05). IDX0001 mostró una reducción del -17,9%, lo cual no fue estadísticamente significativo.

#### Estudio H

25 Para estudiar vías de administración alternativas, se investigó la administración intranasal. En comparación con la administración s.c., se eligieron puntos de tiempo y dosis similares. En el estudio H, se administró la administración intranasal en un protocolo profiláctico, 4 días antes de inducirse el hinchamiento. Esto dio como resultado una reducción eficaz del hinchamiento en comparación con lo que se obtuvo con la administración s.c. La reducción del AUC fue, IDX0920 del -33,8% (P <0,01), IDX0150 del -25,7% (P <0,01), IDX0955 del -17,4% (P <0,05) e IDX0001 del -25,7% (P <0,05).

#### Estudio I

35 Cuando se administró la administración intranasal en el día 0, en el mismo día que se indujo el edema, se encontró una reducción eficaz del hinchamiento. La reducción del AUC fue, IDX0920 del -27,3% (P <0,01), IDX0150 del -28,4% (P <0,01), IDX0955 del -28,8% (P <0,05) e IDX0001 del -6,4% (NS).

#### Estudio J

40 En el protocolo terapéutico tal como se usó en el estudio G, la administración intranasal también dio como resultado una buena reducción del hinchamiento. Se mostró que el AUC se reducía en IDX0920 con el -28,7% (P <0,05), IDX0150 con el -28,8% (P <0,01), IDX0955 con el -17,2% (P <0,05) e IDX0001 con el -25,2% (P <0,05).

#### Estudio K

45 Se investigó la respuesta a la dosis en los estudios K-O. En el estudio K, se administraron 0,1, 1, 10 y 100 µg de IDX0150. El resultado mostró la reducción del hinchamiento de una manera dependiente de la dosis. La reducción del AUC fue; del -13,9% (P <0,05) con 0,1 µg, del -16,3% (P <0,05) con 1 µg, del -27,9% (P <0,05) con 10 µg, y del -45% (P <0,01) con 100 µg.

#### 50 Estudio L

55 Se investigó el control negativo IDX0526, que tenía el motivo CpG sustituido por GC, en un protocolo de respuesta a la dosis similar al estudio K. Se encontró que no había ninguna actividad anti-hinchamiento usando IDX0526. Las diferencias en el AUC fueron; con 0,1 µg del +1,24%, con 1 µg del -1,24%, con 10 µg del -0,26% y con 100 µg del +6,18%, todos cambios no estadísticamente significativos.

#### Estudio M

60 Para investigar la significación del grado de modificación de fosforotioato en el esqueleto del oligonucleótido, se usó un oligonucleótido completamente modificado con fosforotioato, IDX0500. Este compuesto mostró propiedades anti-hinchamiento estadísticamente significativas a todas las dosis sometidas a prueba, con una reducción del AUC para; 0,1 µg del -46,9%, 1 µg del -41,3%, 10 µg del -40,9% y 100 µg del -59,1% (todos P <0,01).

#### 65 Estudio N

Para estudiar adicionalmente el intervalo terapéutico para IDX0500, se emprendió el estudio N. Las dosis fueron de 0,005 µg, 0,01 µg, 0,1 µg y 1 µg. El compuesto mostró un efecto estadísticamente significativo a las dosis de 0,1 y 1 µg lo cual concordaba con el estudio M. La reducción del AUC fue; del -15% para 0,005 µg (NS), del -15,3% para 0,01 µg (NS), del -18,2% para 0,1 µg (P <0,01), y del -54,1% para 1 µg (P <0,01).

#### Estudio O

En este experimento, se compararon IDX0500 e IDX0150 a dosis iguales de 10 y 100 µg administradas por vía s.c. en el día 0. Se obtuvieron resultados similares entre dosis y los dos compuestos, mostrando una reducción estadísticamente significativa del AUC para IDX0500; 10 µg dieron el -25,5%; 100 µg el -39,9%, y para IDX0150 10 µg dieron el -25,5%; 100 µg el -39,9% (todas las dosis P <0,01).

Además de los experimentos realizados con los compuestos de control e IDX0001, todos los demás compuestos de prueba se investigaron de una manera similar en los modelos de edema de oreja de TPA y/o AA, en los que los compuestos de prueba se administraron por vía subcutánea (10 µg) 20 minutos antes de la inducción del edema. Los resultados se expresan como reducción de valor máximo y reducción del área bajo la curva (AUC) en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados obtenidos para los compuestos sometidos a prueba

20

Tabla 5

| SEQ ID NO | IDX, n.º | Secuencia 5'-3'                    | Reducción máxima (%) |       | Reducción del AUC (%) |       |
|-----------|----------|------------------------------------|----------------------|-------|-----------------------|-------|
|           |          |                                    | TPA                  | AA    | TPA                   | AA    |
| 1         | IDX9024  | T*G*C*CATTTCGTCGTTCTCGTC*G*T*<br>T | -30,9                | -14,4 | -47,3                 | -58,5 |
| 2         | IDX9025  | T*G*C*CATTTCGTCGATTTCGTC*G*A*<br>T | -23,5                | -14,9 | -57,8                 | -81,9 |
| 3         | IDX9038  | T*C*G*TCGTTCCGGCCGATCG*T*C*C       | -37,9                | NR    | -47,4                 | NR    |
| 4         | IDX9053  | G*G*G*TCGTCTG*C*G*G                | -30,5                | NR    | -39,0                 | NR    |
| 5         | IDX9076  | T*C*C*CAAGATCGTCC*A*G*G            | -2,6                 | -20,1 | -5,1                  | -45,7 |
| 6         | IDX9078  | T*C*C*GATCGTCC*A*G*G               | -26,1                | -16,4 | -41,3                 | -79,4 |
| 7         | IDX9087  | T*C*G*TCTGCTTAGTTCGTTA*G*T*T       | +0,9                 | NR    | -40,2                 | NR    |
| 9         | IDX9051  | G*G*G*GCGTCTGCC*G*G*G              | -29,5                | -17,7 | -54,0                 | -67,5 |
| 10        | IDX9064  | T*C*C*ATGGTCAGGGTCCCGG*G*G*<br>G   | -41,7                | NR    | -59,7                 | NR    |

25

NR = no realizado

#### Valores máximos

También se compararon los valores máximos y de AUC con el fin de estratificar la eficacia anti-hinchamiento de los diferentes esquemas de tratamiento.

#### Discusión

Los presentes experimentos abordaron regímenes de tratamiento profiláctico y terapéutico prolongados usando vías intraperitoneal, subcutánea e intranasal. Además, se investigó la respuesta a la dosis usando los compuestos IDX0150 e IDX0500 (SEQ ID NO 11 y 12, respectivamente).

Puede realizarse un seguimiento del grado de edema midiendo la formación de edema o el hinchamiento tras el tratamiento con TPA tópico del oído externo en ratones. Este hinchamiento presenta normalmente un máximo tras 24 horas y después disminuye gradualmente durante una semana.

Se encontró que todos los valores de AUC y máximos eran inferiores a los del control positivo. En la mayoría de los casos esta reducción del hinchamiento era estadísticamente significativa (P <0,05). Sin embargo, en algunos experimentos, no se alcanzó una reducción estadísticamente significativa. Esto se ha observado en relación con la inducción de edema de grado bajo en todo el experimento como tal. Para evitar esto, se tuvo especial cuidado de optimizar la dosis de TPA y usando ratones inmunológicamente maduros.

45

El edema de oreja puede estudiarse obteniendo el valor máximo de edema inducido por TPA y calculando el área bajo la curva (AUC) a partir de todas las medidas de edema. Por tanto, el AUC representa tanto la inducción como la remisión del edema.

- 5 Calculando el valor máximo promedio a partir de los diez experimentos con IDX0150 (figura 2), se encontró una reducción estadística significativa muy alta de los valores máximos ( $P < 0,001$ ).

Por tanto, se usó IDX0150 como norma para comparaciones con los demás compuestos en este estudio.

- 10 Los efectos anti-hinchamiento de IDX0150 (0,1 - 100  $\mu\text{g}$ ) e IDX0500 (0,005 - 100  $\mu\text{g}$ ) mostraron un amplio intervalo de respuesta a la dosis. El efecto anti-hinchamiento de IDX0150 administrado en diferentes puntos de tiempo, calculado como la reducción del valor máximo, disminuyó en el siguiente orden: 2 h > día -2 > día 0 > día -4.

- 15 La reducción del AUC disminuyó en el siguiente orden: 2 h > día 0 > día -2 > día -4. Estos resultados indican que estos compuestos pueden usarse tanto para la administración profiláctica como para el tratamiento tras haber comenzado el hinchamiento. Los resultados muy buenos con la administración intranasal muestran que la administración mucosa es eficaz para presentar compuestos oligonucleotídicos al sistema inmunitario en el organismo.

## 20 *Conclusión*

- Los estudios A-O respaldan de manera colectiva el efecto anti-hinchamiento de los compuestos de la invención en el modelo de edema de oreja inducido por TPA en ratones. Estos compuestos son agentes inmunomoduladores eficaces cuando se administran por vías de administración intraperitoneal, subcutánea e intranasal, y su eficacia para reducir el edema también se demostró en diferentes esquemas profilácticos y terapéuticos tal como se muestra a modo de ejemplo mediante IDX0150 en las figuras 1-3. El efecto anti-hinchamiento de los compuestos no se limita a una ruta inflamatoria general, sino que también puede regular por disminución la inflamación inducida por AA que, por ejemplo, activa el sistema de prostaglandina. Todos los compuestos de prueba SEQ ID NO 1 – 10 pudieron reducir el edema tal como se muestra en el modelo de TPA y/o AA.

- 30 2. La administración nasal de sustancias de prueba oligonucleotídicas inmunomoduladoras en un modelo murino de ovalbúmina (OVA) indujo inflamación de las vías respiratorias: una comparación de diferentes protocolos profilácticos y terapéuticos

## 35 *Materiales y métodos*

### *Animales*

- 40 Se usaron ratones Balb/c hembra (8 semanas), obtenidos de B&K (Sollentuna, Estocolmo, Suecia), en el experimento. Se alimentaron los ratones con una dieta para roedores de pienso completa, R36 (Laktamin AB, Estocolmo, Suecia) y agua de calidad potable doméstica a voluntad. Se mantuvieron los animales en salas para animales a  $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , y con una humedad relativa del  $55\% \pm 15\%$ . El sistema de ventilación se diseñó para proporcionar 10 cambios de aire por hora. Se iluminó la sala para proporcionar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La luz se proporcionó desde las 07:00 h hasta las 19:00 h. Se mantuvieron los ratones en jaulas de policarbonato transparente (Macrolone tipo III) (área de suelo:  $820 \text{ cm}^2$ ), 5 en cada jaula. El lecho en las jaulas era lecho 4HV Aspen (Tapvei, Finlandia). Cada jaula se identificó mediante una tarjeta de jaula marcada con el número de estudio, número de grupo, sexí y números de animales.

### Sensibilización y exposición a aerosol

- 50 Se sensibilizaron los ratones por vía intraperitoneal con 200  $\mu\text{l}$  de OVA/gel de hidróxido de aluminio (1:3) en el día 0 y 12 (véase la figura 6). Se disolvió OVA (albúmina de huevo de pollo de calidad V, Sigma, St. Louis, MO) en solución salina y se mezcló con gel de hidróxido de aluminio hasta una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mediante rotación a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 3 h. En los días 23, 26, 30 y 33 (véase la figura 6), se expusieron los pulmones de los ratones mediante inhalación de OVA en aerosol durante 30 minutos usando una cámara de exposición Batelle. Se generaron aerosoles mediante un nebulizador de aire comprimido (Collison de 6 chorros) a un flujo de aire de 7,4 l/min usando una concentración de nebulizador de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de OVA disuelto en PBS (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.). El grupo de control con animales sin sensibilizar no recibió ningún otro tratamiento distinto de OVA en aerosol en los días 23, 26, 30 y 33. También hubo un grupo de control de ratones sensibilizados que no recibieron exposición a aerosol.

### 60 Oligonucleótidos

- En este modelo de OVA (figura 6), se sometió a prueba un total de 4 oligonucleótidos, IDX9025, IDX9038, IDX9053 (tabla 1, SEQ ID NO 2-4) e IDX0150 (tabla 3, SEQ ID NO 11). Los oligonucleótidos se sintetizaron por biomers.net GmbH, Ulm, Alemania, y se almacenaron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se diluyeron los oligonucleótidos con PBS hasta la

concentración de trabajo (1,247 µg/ml) y se mantuvieron a -20°C hasta el primer día de instilación, después de eso se colocaron a 4°C.

Tratamiento de inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA

En un primer experimento, se sometieron a prueba protocolo tanto profiláctico como terapéutico (véase la figura 6). El tratamiento con fármaco consistió en instilaciones intranasales de IDX0150 (1,247 µg/ml, proporcionado por InDex Pharmaceuticals AB, Estocolmo, Suecia) en los días 16 y 21 (protocolo profiláctico), en los días 30 y 33 (protocolo terapéutico A) o en los días 30 y 34 (protocolo terapéutico B). Las instilaciones en los protocolos terapéuticos (A y B) en los días 30 y 33 se administraron 4 h tras la exposición a aerosol. La segunda instilación en el protocolo B en el día 34 se administró 24 h tras la última exposición a aerosol. El fármaco se administró en 40 µl de PBS administrando una dosis de ~50 µg/ratón (49,88 µg/ratón). Los dos grupos de tratamiento simulado sensibilizados recibieron instilaciones con PBS, el mismo volumen total que para los grupos de tratamiento, según o bien el protocolo profiláctico (días 16 y 21) o bien el protocolo terapéutico A (días 30 y 33).

Tabla 6. Grupos experimentales en la inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA

Tabla 6

| Grupos | n | Inmunizado con OVA | Aerosol de OVA | Tratamiento           | Dosis     |
|--------|---|--------------------|----------------|-----------------------|-----------|
| 1      | 4 | No                 | Sí             | PBS                   | -         |
| 2      | 5 | Sí                 | Sí             | 2 x PBS profiláctico  | -         |
| 3      | 5 | Sí                 | Sí             | IDX0150 profiláctico  | 2 x 50 µg |
| 4      | 5 | Sí                 | Sí             | 2 x PBS terapéutico A | -         |
| 5      | 5 | Sí                 | Sí             | IDX0150 terapéutico A | 2 x 50 µg |
| 6      | 5 | Sí                 | Sí             | IDX0150 terapéutico B | 2 x 50 µg |
| 7      | 4 | Sí                 | No             | PBS                   | -         |

En un segundo experimento, dado que la administración de IDX0150 en el primer experimento usando el protocolo profiláctico (figura 6) dio una a reducción significativa de la inflamación de las vías respiratorias (figura7), se sometieron a prueba otras tres sustancias con el mismo protocolo. El tratamiento farmacológico consistió en instilaciones intranasales de IDX9025, IDX9038 e IDX9053 (tabla 1) (1,247 µg/ml, proporcionados por InDex Pharmaceuticals AB) en los días 16 y 21 (véase la figura 6, protocolo profiláctico). Todas las sustancias se administraron en 40 µl de PBS administrando una dosis de ~50 µg/ratón (49,88 µg/ratón). Los dos grupos de tratamiento simulado sensibilizados recibieron instilaciones con PBS, el mismo volumen total que para los grupos de tratamiento, según el protocolo profiláctico (días 16 y 21).

*Análisis de parámetros de inflamación de las vías respiratorias*

Se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical 42 h tras la última exposición a aerosol de OVA. Se introdujeron cánulas en la tráquea con tubos de polietileno (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.) y se realizó un lavado bronquioalveolar (BAL) usando 4 x alícuotas de 1 ml de solución salina equilibrada de Hank helada (HBSS) (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.). Se centrifugó el líquido de BAL (400 g, 10 min, 4°C) y se resuspendieron las células del líquido de BAL en 0,4 ml de PBS. Se contó el número total de leucocitos usando exclusión con azul de tripano en una cámara de Burker. Se tiñeron preparaciones de Cytospin por duplicado (Cytospin 3, Shandon, Runcorn, R.U.) de células de líquido de BAL con May Grünwald Giemsa para determinar el recuento diferencial, usando criterios morfológicos convencionales.

Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones estadísticas usando análisis de la varianza (ANOVA) de un factor usando corrección a posteriori de Dunnett para la comparación con ratones de control tratados con PBS sensibilizados (GraphPad Prism 3). Se muestran los datos como media ± desviación estándar. Se consideró P< 0,05 como significativo.

Resultados

El modelo de asma alérgico inducido por ovalbúmina es un modelo ampliamente usado para reproducir la inflamación pulmonar encontrada durante el asma. Los resultados obtenidos en este caso se correlacionan con el hinchamiento de la membrana mucosa de las vías respiratorias, y por tanto los resultados son una medida relevante de la reducción del edema. El análisis de este modelo se basa en indicadores generales del asma tales como análisis de BAL en el que se identifica y se cuenta el tipo y la cantidad de células inflamatorias infiltrantes tales como células polimorfonucleares (PMN).

Por consiguiente, se contaron las células de líquido de BAL derivadas de cada ratón tal como se describió y se representan los valores gráficamente como un histograma combinado que proporciona valores medios para los

diferentes grupos de tratamiento (figura 7).

En términos generales, el nivel de inflamación de las vías respiratorias inducida fue alto tal como se indica mediante un gran flujo entrante de los 4 tipos de células analizadas en los pulmones de los animales (grupo de PBS) en ambos experimentos. Los grupos de control (“sin aerosol” y “sin exposición”) no demostraron ningún signo de inflamación inducida, confirmando que los animales no mostraban una respuesta alérgica natural a la proteína ovalbúmina en aerosol y que la proteína ovalbúmina usada no estaba contaminada, por ejemplo, con LPS.

La completa ausencia de cualquier signo de inflamación en los grupos de control “sin aerosol” confirmó que el propio procedimiento experimental de inmunización con OVA no inducía inflamación pulmonar.

Tras el tratamiento nasal en un protocolo profiláctico cuando se administró dos veces, 7 y 2 días antes de la exposición de inflamación, el elemento de prueba IDX0150 pudo reducir significativamente la migración de leucocitos y eosinófilos al interior del líquido de BAL ( $P < 0,05$  y  $P < 0,001$  respectivamente) (figura 7).

En la rama terapéutica de este protocolo, cuando se administró IDX0150 7 y 11 días tras la exposición de inflamación, es decir muy tarde en el periodo del experimento, no se demostró estadísticamente ningún efecto.

Tras el tratamiento nasal en el segundo experimento (figura 8), la sustancia de prueba IDX9038 pudo reducir significativamente la migración de leucocitos ( $P < 0,05$ ) y eosinófilos ( $P < 0,001$ ) al interior del líquido de BALF. IDX9025 e IDX9053 no mostraron ninguna reducción significativa de la migración celular al interior del líquido de BALF en este experimento.

### Conclusiones

Este estudio *in vivo* proporciona la siguiente conclusión: Se observó una reducción estadísticamente significativa en el número de leucocitos, eosinófilos y linfocitos que se infiltran en el líquido de BAL en animales cuando se trataron con los compuestos de la invención. En este modelo, resultó más apropiado medir la inflamación, pero los resultados son igualmente aplicables para el edema. Además, el estudio confirmó la idoneidad de la administración nasal como vía eficaz.

### 3. Pleuresía inducida por tioglicolato en ratones C57/Bl6

#### Materiales y métodos

Se configuró un modelo animal para estudiar el efecto de oligonucleótidos según una realización de la presente invención sobre la migración celular y la permeabilidad vascular.

Se anestesiaron ratones mediante una inyección intraperitoneal de 0,15-0,20 ml de una mezcla de ketamina (Ketalar® Parke-Davis; 25 µg/ml) y xilazina (Narcoxilo vet.® Veterinaria AG; 5 mg/ml).

Se introdujeron cánulas en la vena yugular izquierda con tubos de polietileno (PE10) para la administración intravenosa (i.v.). Se realizó una incisión en la piel en el lado derecho del tórax. Tras la disección del músculo subyacente, se indujo pleuresía (inflamación del saco pulmonar) mediante una única inyección intrapleurales de 100 µl de tioglicolato (Sigma). Se usó PBS estéril como control negativo.

Se inyectó por vía i.v. dextrano conjugado con FITC en PBS (100 µl, 30 mg/ml). Tras 4 h, se sacrificaron los animales con una sobredosis de anestesia, se abrió cuidadosamente el tórax y se extrajo el exudado mediante aspiración y se anotó el volumen. Entonces se aclaró el tórax con 1 ml de EDTA 3 mM helado en PBS. Se descartó el exudado que estaba contaminado con glóbulos rojos.

Se centrifugó el exudado y el material aclarado a 1500 g durante 5 min y se usó el sobrenadante para medir la intensidad de fluorescencia en un fluorímetro (Fluoroskan Acsent, LabSystems) y se calculó el volumen de aclaramiento de FITC-dextrano. Se resuspendió el sedimento en PBS con BSA al 0,1% durante 15 min para bloquear la unión de anticuerpos no específicos. Se usaron 10 µl de suspensión celular para determinar el recuento diferencial de glóbulos blancos (WBC) en una cámara Burkner.

Se tiñeron las células del exudado con anticuerpos específicos para neutrófilos y macrófagos y se analizaron mediante citometría de flujo (FACSsort y software CellQuest, BD). El análisis incluyó el recuento total de glóbulos blancos, basándose en sus apariciones típicas en la dispersión frontal y lateral. Se identificaron adicionalmente PMN y macrófagos mediante su expresión de Ly6G y F4/80, respectivamente.

Con el fin de someter a prueba el efecto de oligonucleótidos según realizaciones de la presente invención, el compuesto que iba a someterse a prueba se administró por vía intraperitoneal, a una dosis de 100 µl, es decir 50 µg/ratón, aproximadamente 20 minutos antes de la inducción de pleuresía. En este estudio, el compuesto

sometido a prueba fue IDX0150 (SEQ ID NO 11, tabla 3).

#### Resultados

- 5 El modelo de pleuresía inducida por tioglicolato es uno de los modelos de elección para el examen práctico de nuevos fármacos en desarrollo, aunque es técnicamente complicado y puede mostrar valores discrepantes individuales ocasionales. Sin embargo, este modelo está limitado en cuanto al número de animales que pueden someterse a prueba simultáneamente.
- 10 Los resultados mostraron que los animales respondieron al agente que inducía la inflamación, tioglicolato, mediante una alta inmigración de PMN al interior de la cavidad pleural. Esta reacción celular se vio reflejada en la acumulación de edema pleural observado como un alto volumen de aclaramiento. El tratamiento con IDX0150 redujo el reclutamiento de PMN (reducción del 42%) tras la inducción de inflamación por tioglicolato (figura 9a). El tratamiento con IDX0150 también demostró un bajo nivel de permeabilidad vascular (reducción del 68,2%) similar al control de
- 15 PBS (figura 9b). Los resultados representan la media  $\pm$  DE.

Hu *et al.*, (2008) investigaron la contribución de la ruta vesicular transendotelial a la formación de edema. El grupo mostró que la permeabilidad vascular pulmonar puede verse inducida mediante activación de PMN adherentes a la pared del vaso, y el edema más intenso se observó con el mayor número de PMN. Los compuestos según realizaciones de la presente invención muestran claramente una reducción de los PMN (figuras 7, 8 y 9a), y por consiguiente una reducción del edema (figura 9b). Los experimentos usando un anticuerpo anti-PMN mostraron que el Ac anti-PMN podía reducir igualmente PMN y el edema hasta niveles similares a los compuestos de la invención (datos no mostrados).

#### 25 Conclusión

Estos resultados en el modelo animal de pleuresía indican el hecho de que el compuesto tiene un perfil de tratamiento preferible adecuado para pruebas adicionales y desarrollo de fármacos.

#### 30 Bibliografía

- Guochang Hu, Stephen M. Vogel, David E. Schwartz, Asrar B. Malik, Richard D. Minshall. (2008) Intercellular Adhesion Molecule-1-Dependent Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells Induces Caveolae-Mediated Pulmonary Vascular Hyperpermeability. *Circ Res.* 102:e120-e131.
- 35 A. Gennaro (Ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Compuesto oligonucleotídico aislado y sustancialmente purificado que comprende una secuencia según SEQ ID NO 6 (IDX 9078).
2. Compuesto oligonucleotídico según la reivindicación 1, en el que la longitud total del compuesto es de entre 12 y 30 bases.
- 10 3. Oligonucleótido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido está químicamente modificado.
4. Oligonucleótido según la reivindicación 1, en el que al menos un nucleótido tiene una modificación en el esqueleto de fosfato.
- 15 5. Oligonucleótido según la reivindicación 6, en el que la modificación en el esqueleto de fosfato es una modificación de fosforotioato o fosforoditioato.
6. Composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 7. Composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido según la reivindicación 6, que comprende además un excipiente o portador farmacológicamente compatible y fisiológicamente aceptable.
8. Composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido según la reivindicación 6, que comprende además un excipiente o portador farmacológicamente compatible y fisiológicamente aceptable elegido de 25 solución salina, liposomas, tensioactivos, compuestos mucoadhesivos, inhibidores enzimáticos, sales biliares, potenciadores de la absorción y ciclodextrinas.
9. Formulación farmacéutica para su administración mucosa, que comprende un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 10. Uso de un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, el tratamiento y/o el alivio de edema.
- 35 11. Uso según la reivindicación 10, en el que edema es un trastorno o disfunción del equilibrio del líquido intersticial en cualquier órgano o tejido, asociado con un estado elegido de insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática, enfermedades renales tales como síndrome nefrótico, malnutrición, cáncer, asma, rinitis alérgica, EPOC, isquemia, traumatismo y choque séptico.
- 40 12. Uso según la reivindicación 10, en el que dicho oligonucleótido se administra en una cantidad eficaz para lograr uno de regulación de la permeabilidad vascular; inhibición o reducción de la migración de leucocitos; inhibición o reducción de la migración o activación de neutrófilos; inhibición o reducción de la migración de eosinófilos; e inhibición o reducción de la migración de linfocitos.
- 45 13. Uso de un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, el tratamiento y/o el alivio de edema, en el que el oligonucleótido es SEQ ID NO 6, y se administra en una dosis y forma de administración eficaz para tratar o aliviar asma mediante inhibición o reducción de la migración o activación de neutrófilos.

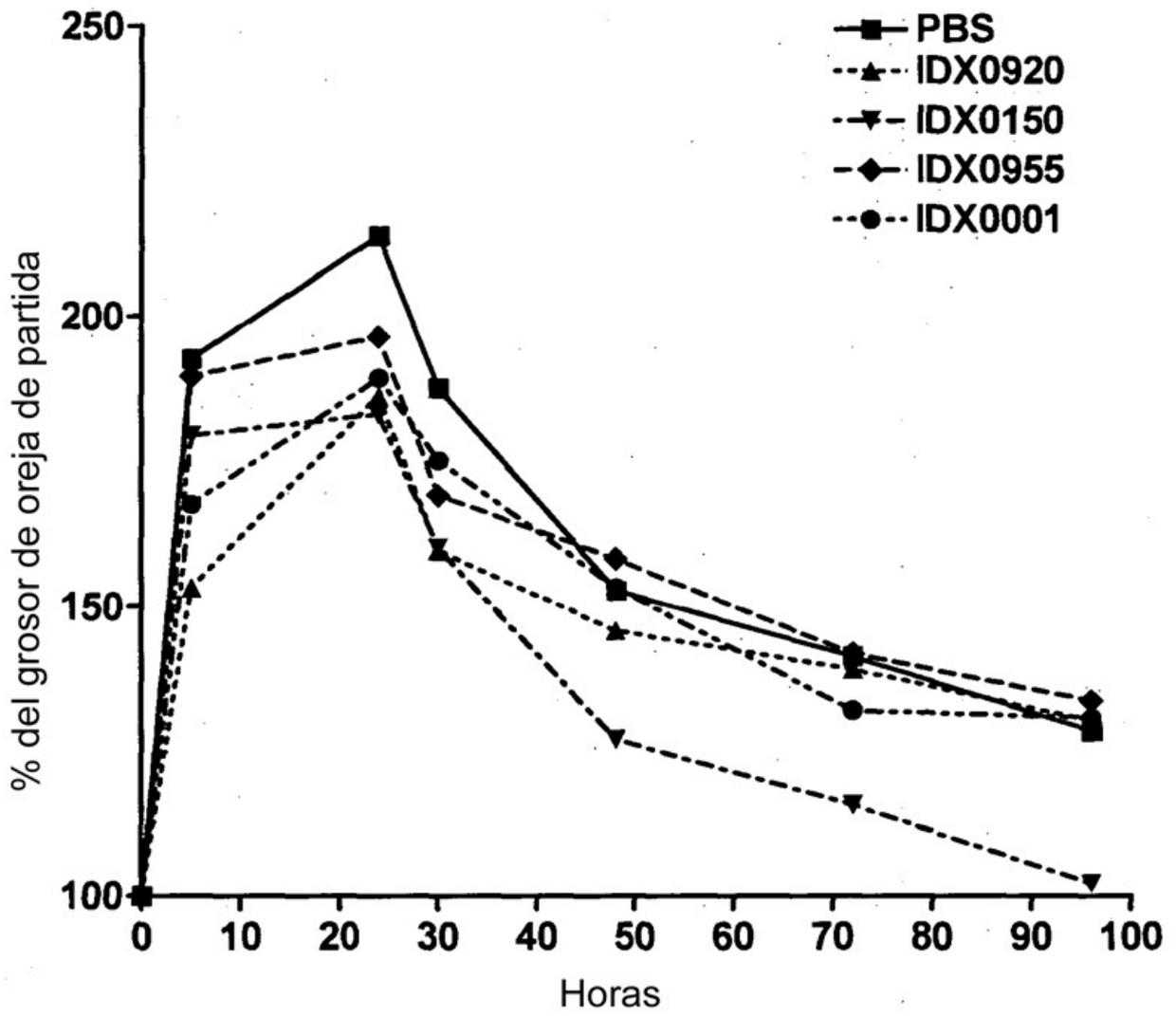


Fig. 1

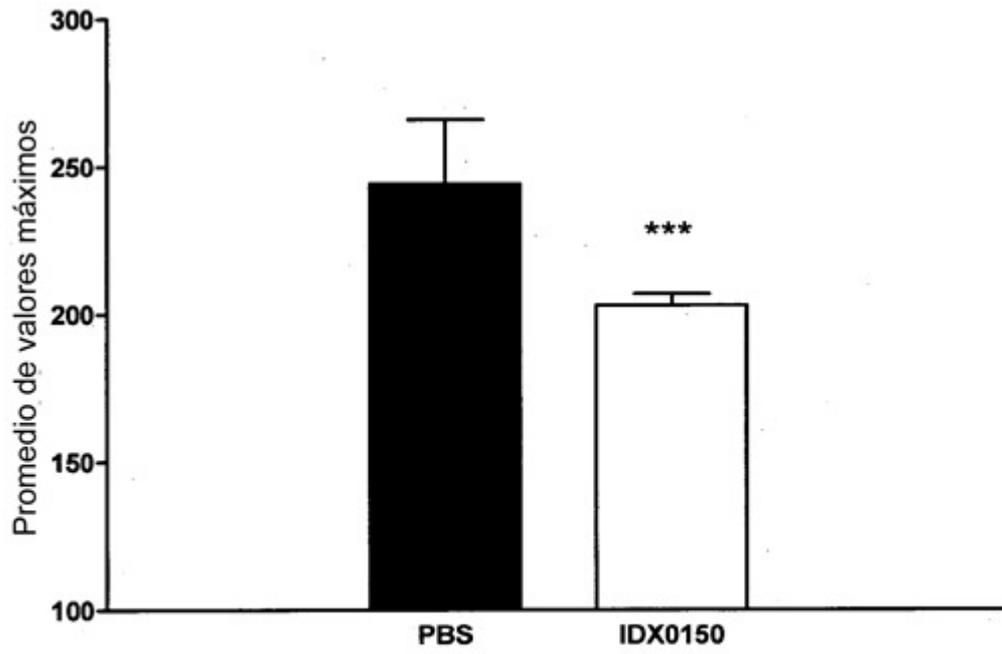


Fig. 2

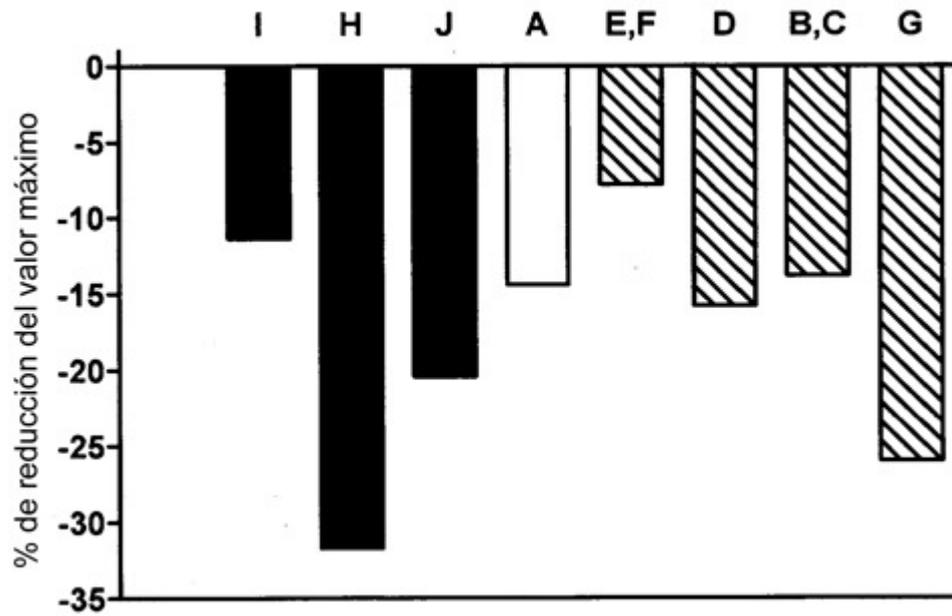


Fig. 3a

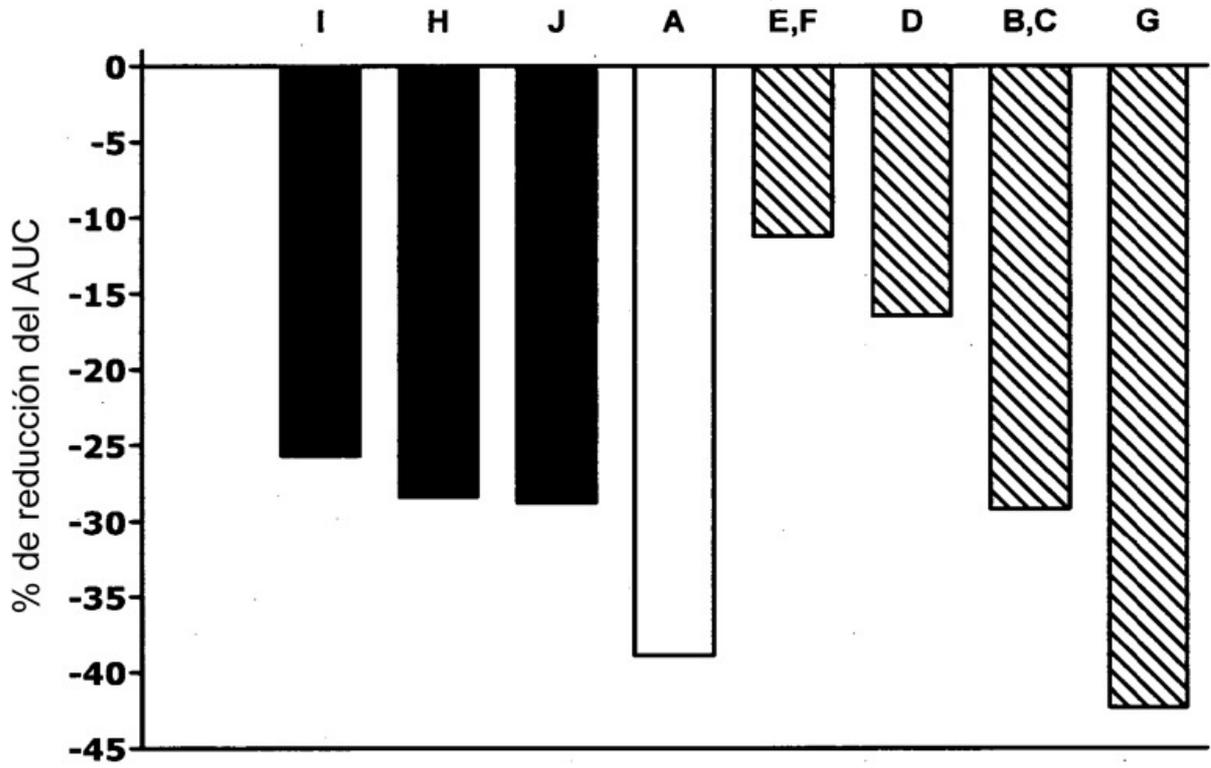


Fig. 3b

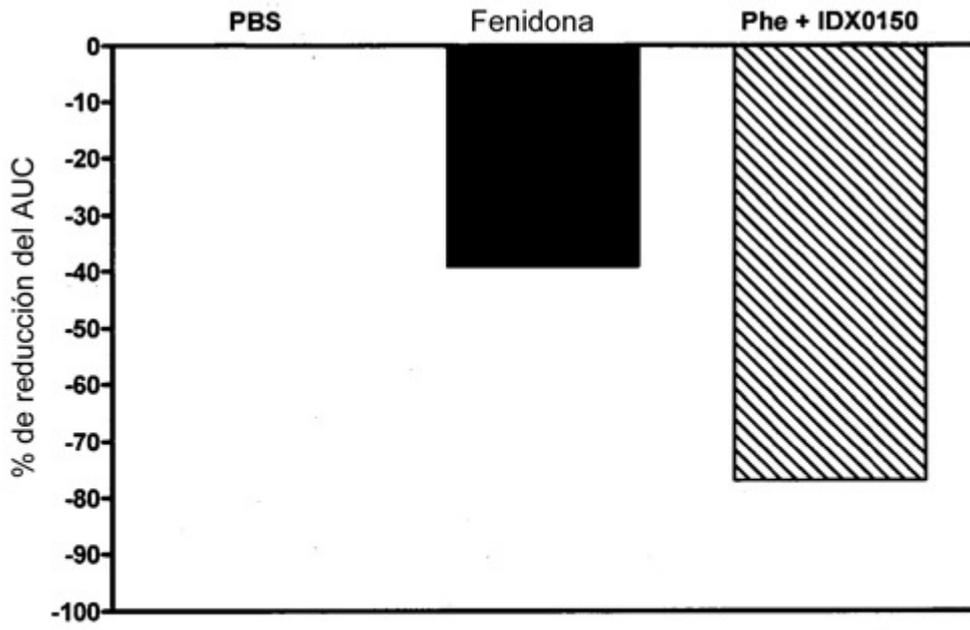


Fig. 4

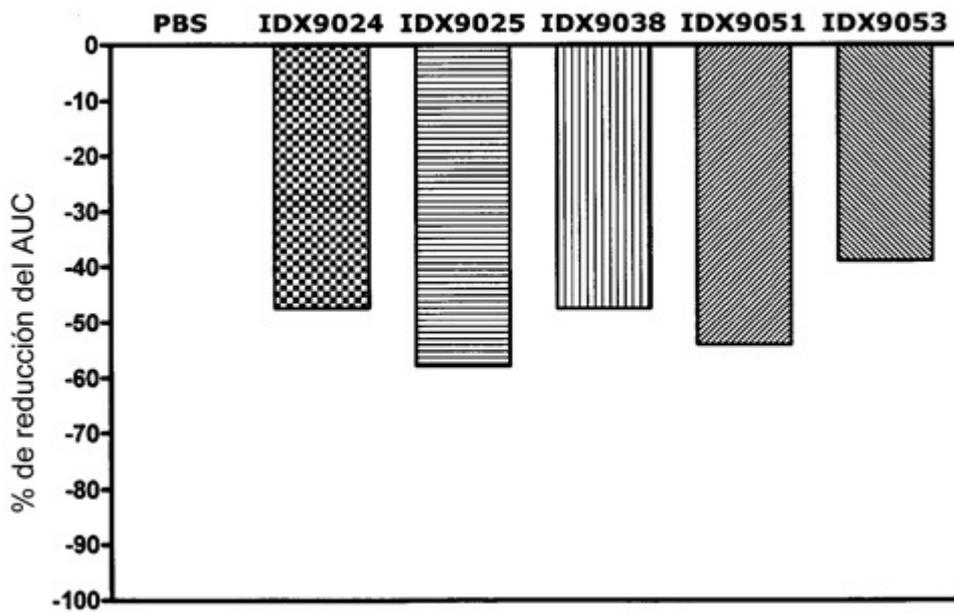


Fig. 5a

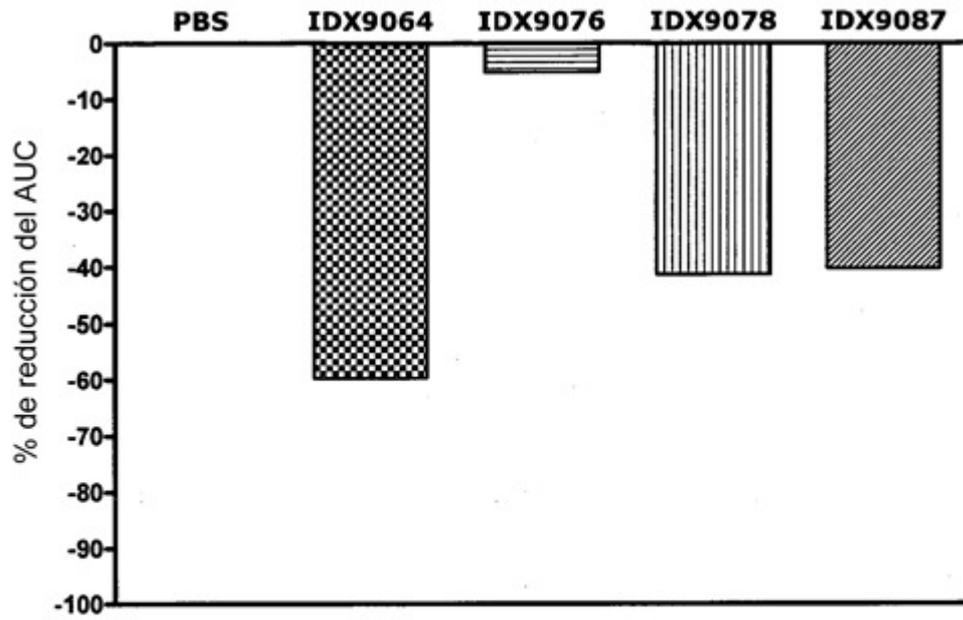


Fig. 5b

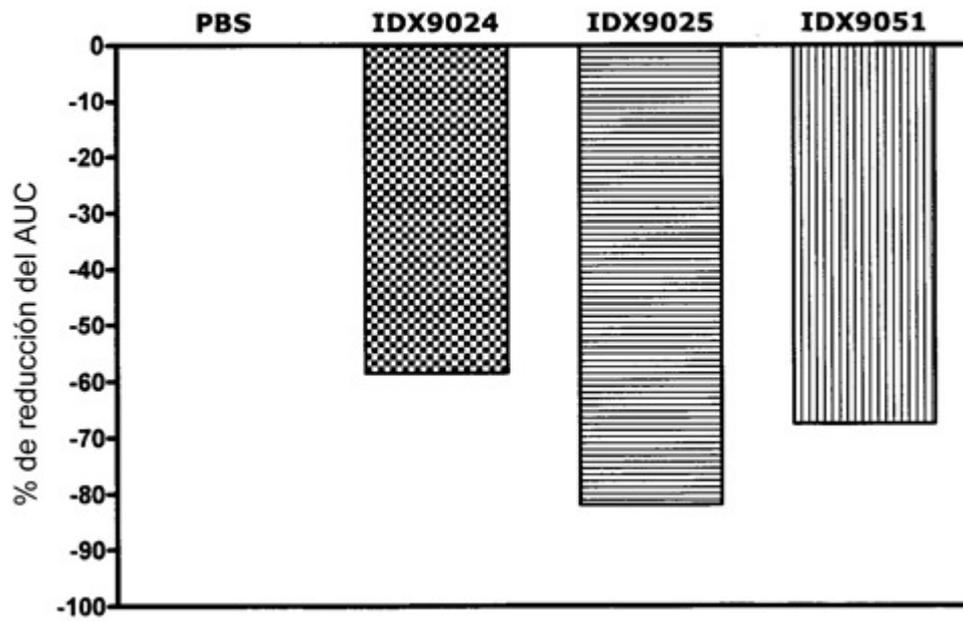


Fig. 5c

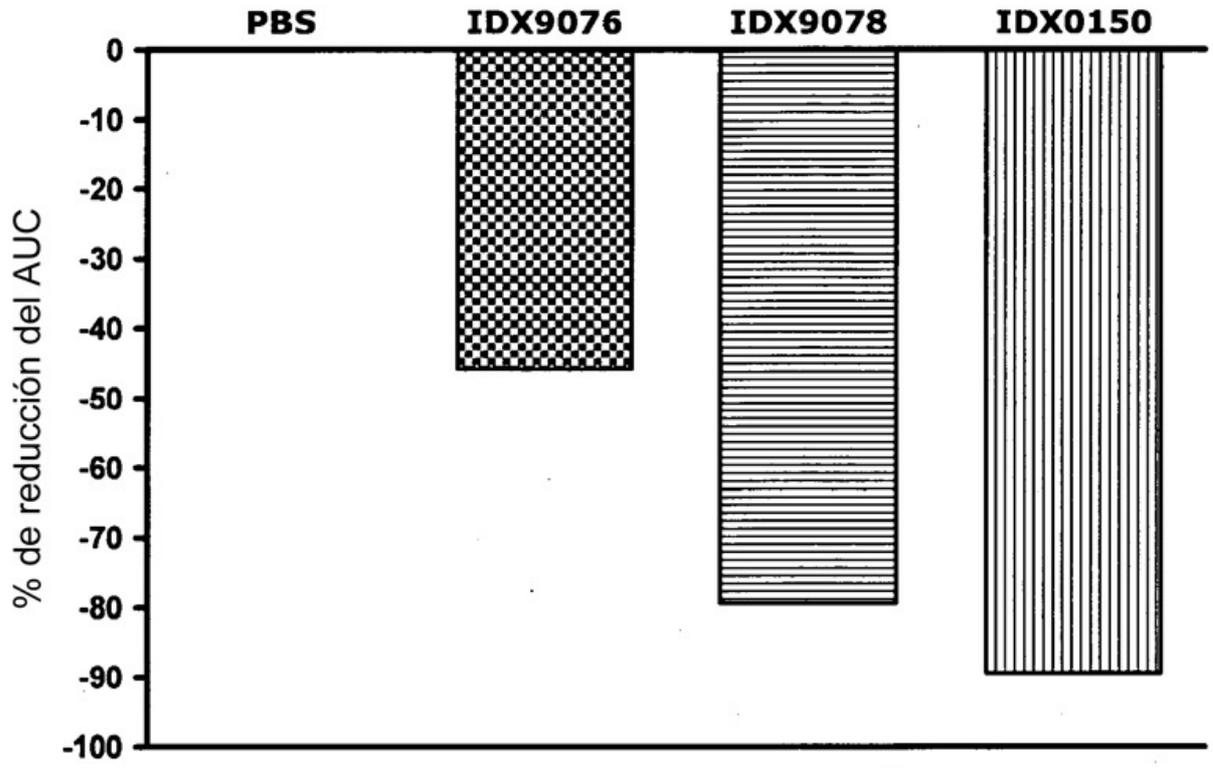
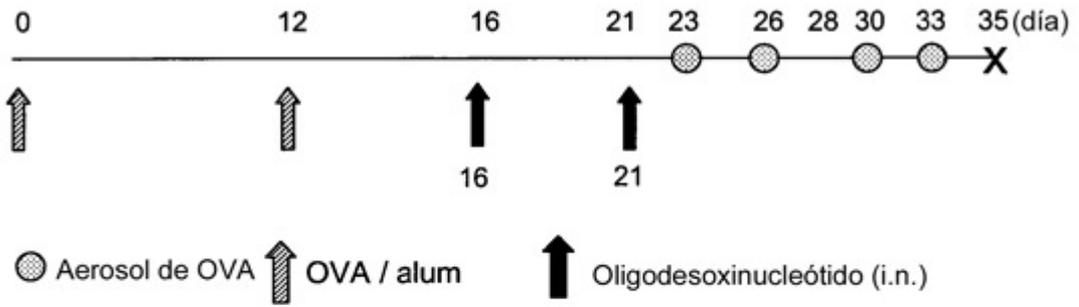
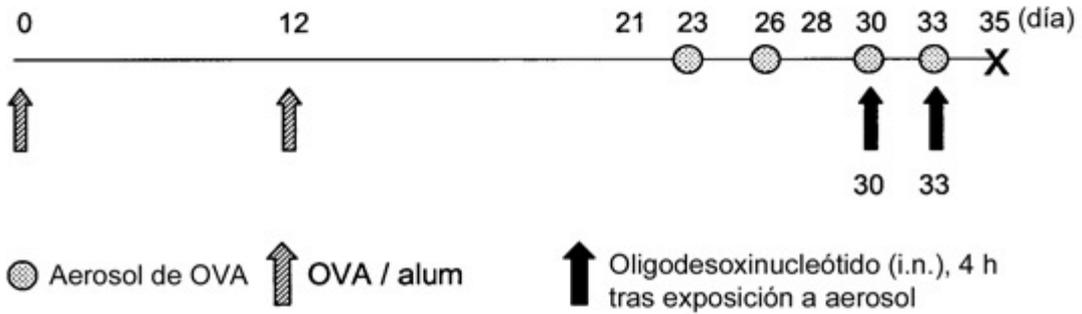


Fig. 5d

### Protocolo profiláctico



### Protocolo terapéutico A



### Protocolo terapéutico B

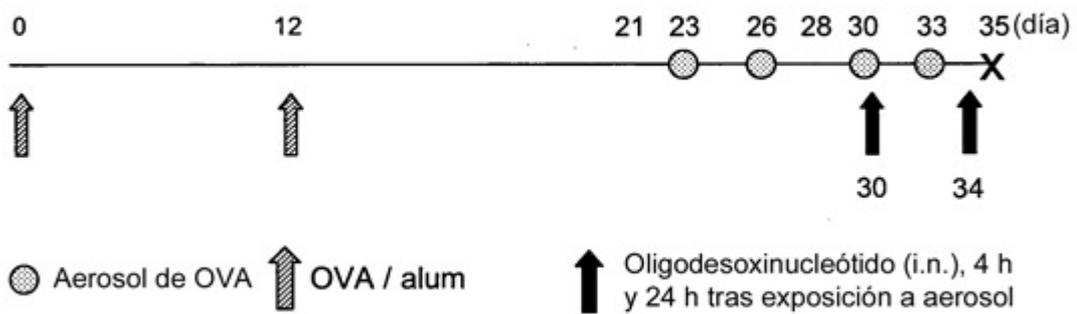


Fig. 6

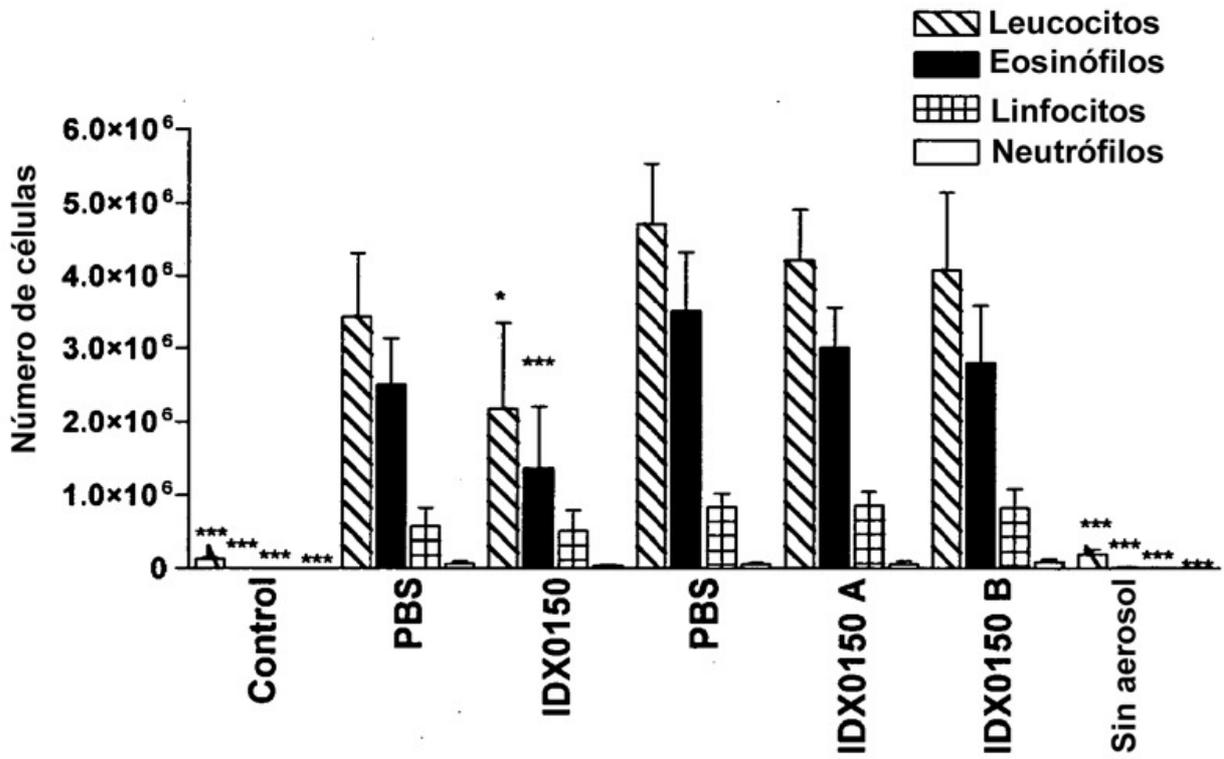


Fig. 7

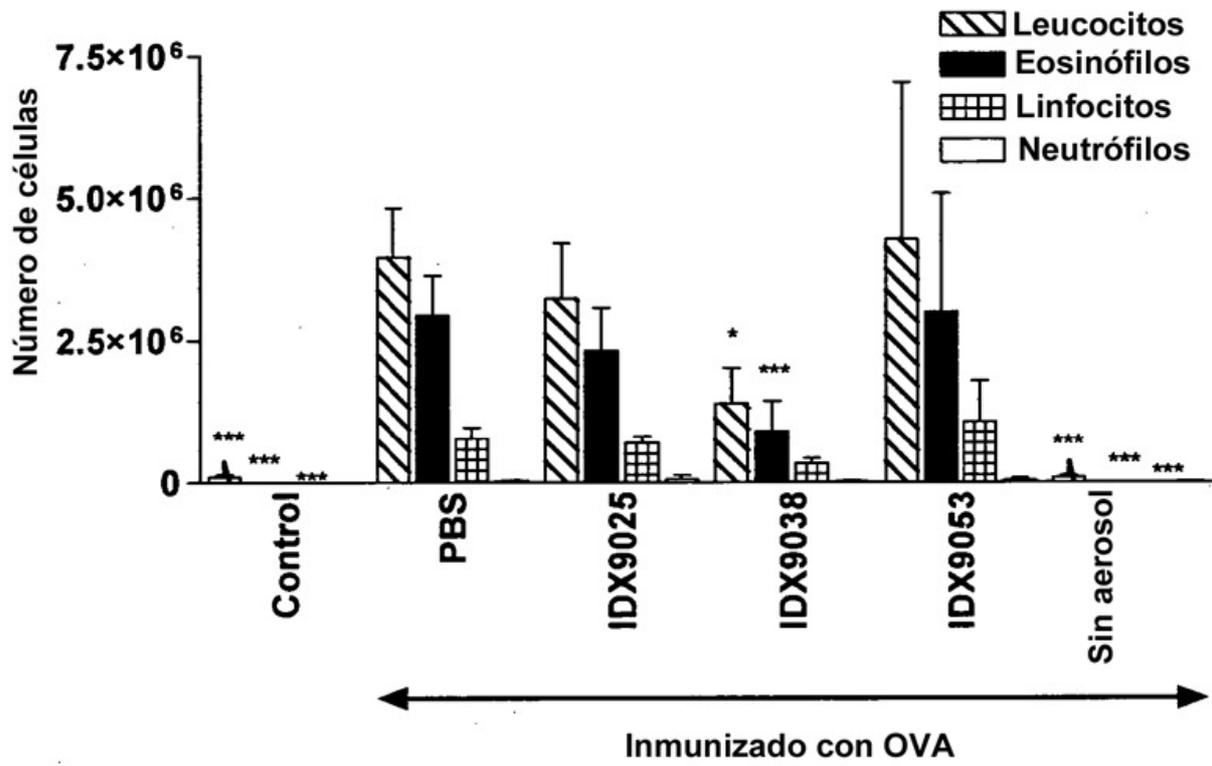


Fig. 8

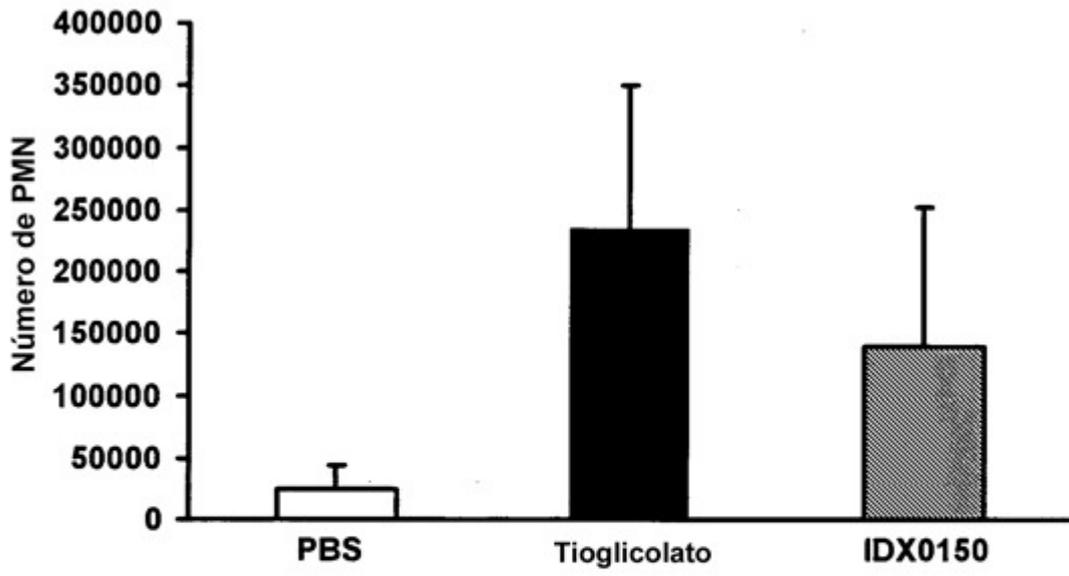


Fig. 9a

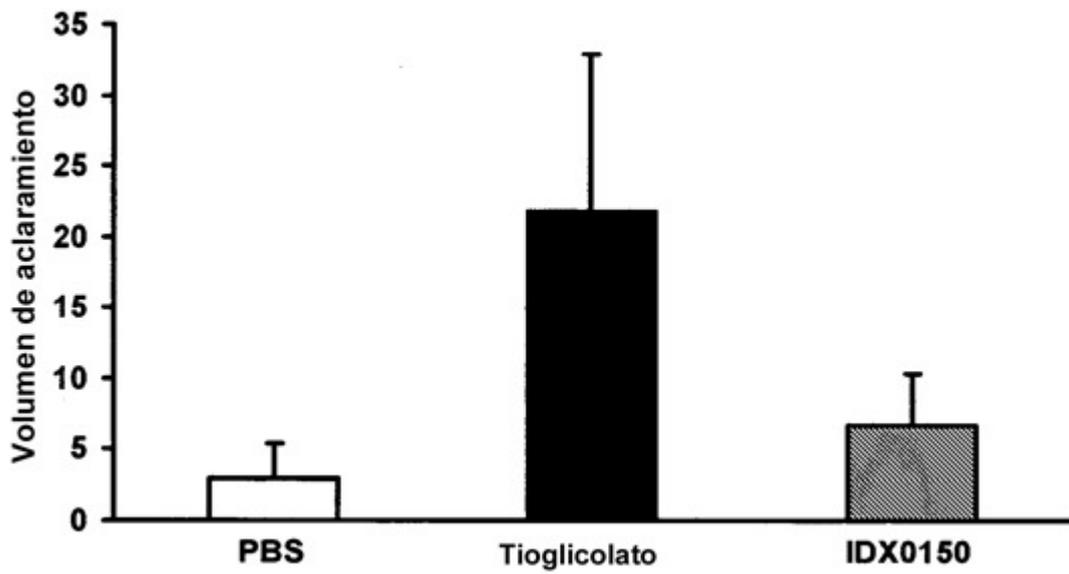


Fig. 9b