

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 097**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2010** **E 15165966 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017** **EP 2960333**

54 Título: **Composición para inhibir la expresión de genes y sus usos**

30 Prioridad:

27.08.2009 US 275252 P
08.09.2009 US 240553 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 646 097 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

Composición para inhibir la expresión de genes y sus usos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a los compuestos, las composiciones y los métodos de uso para la inhibición de la expresión y/o actividad de genes o para diagnosticar, tratar y/o prevenir enfermedades y/o afecciones que responden a la inhibición de la expresión y/o la actividad de genes.

Resumen de la técnica relacionada

15 Un enfoque para inhibir la expresión de genes es la tecnología antisentido o la inhibición del RNA (RNAi). Éstos enfoques hacen uso de la unión específica de la secuencia de oligonucleótidos en base a DNA y/o RNA para seleccionar objetivos de mRNA, microRNA, preRNA o RNA mitocondrial o y la inhibición de la traducción que resulta de éstos. Esta inhibición en base a oligonucleótidos de la traducción y, al final, la expresión de genes es el resultado de uno o más mecanismos celulares, que pueden incluir, pero no se limitan a (i) el bloqueo directo (estérico) de la traducción, 20 (ii) la inhibición mediada por RNasa H, y (iii) la inhibición mediada por RNAi (por ejemplo, RNA interferente corto (siRNA), microRNA (miRNA), RNAi dirigido por DNA (ddRNAi) y RNAi monocatenario (ssRNAi)).

25 La historia de la tecnología antisentido ha revelado que aunque la determinación de oligonucleótidos antisentido que se unen al mRNA es relativamente sencillo, la optimización de los oligonucleótidos antisentido que tienen potencial verdadero para inhibir la expresión de genes y, por lo tanto, ser buenos candidatos clínicos, no lo es. Como consecuencia, si un enfoque en base a oligonucleótidos para que la regulación negativa de la expresión de genes tenga éxito, es necesario optimizar los oligonucleótidos antisentido que logren este resultado con la máxima eficiencia. Tales oligonucleótidos antisentido optimizados podrían usarse solos o junto con otras composiciones profilácticas y/o 30 terapéuticas.

Dado que Zamecnik y Stephenson publicaron la primera demostración de usar oligonucleótidos antisentido como un medio para inhibir la traducción de proteínas virales (Zamecnik y Stephenson (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 285-288), ha existido un gran interés en utilizar compuestos basados en oligonucleótidos para inhibir la expresión de genes. Éstos 35 esfuerzos iniciales utilizaron oligodesoxirribonucleótidos u oligorribonucleótidos, no modificados, monocatenarios (Agrawal y otros (1992) Ann. NY Acad. Sci. 660:2-10), que son intrínsecamente inestables in vivo, para unirse al mRNA in vivo y crear un molde de RNA bicatenario para la degradación enzimática o RNAasa. Se hicieron esfuerzos posteriores para determinar la utilidad de los oligodesoxirribonucleótidos que incorporaban enlaces fosforotioato y/o metilfosfonato resistentes a las nucleasas (Agrawal y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:7079-7083; Metelev & Agrawal US 5,652,355; Metelev & Agrawal US 6,143,881; Matsukura y otros (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 40 84:7706).

Otra clase de moléculas en base a RNA que inhiben la expresión de genes se denominan ribozimas. Las ribozimas forman estructuras de tallo lazo y se unen a un objetivo de RNA para mediar su escisión directamente (Cech, T. (1990) Ann. Rev. Biochem. 59:543). Las ribozimas se unen selectivamente al RNA objetivo y catalizan una esterificación trans 45 o una reacción de hidrólisis para escindir enlaces de fosfodiéster específicos en el RNA monocatenario. Si se introduce en las células, las ribozimas tienen el potencial de unirse al mRNA objetivo e inhibir la traducción de ese mRNA. Como con las tecnologías antisentido monocatenarias, la estabilidad y la actividad de las ribozimas se han mejorado a través de la incorporación de ciertas modificaciones químicas en la estructura de la ribozima (Goodchild US 6,204,027; Goodchild US 6,573,072). Aunque las tecnologías de oligonucleótidos antisentido y ribozima continúan avanzando, se 50 están realizando descubrimientos con otras tecnologías en base a oligonucleótidos.

En base a los descubrimientos pioneros de Fire y Mello (Fire y otros (1998) Nature, 391:806-811), los esfuerzos se han dirigido hacia las tecnologías de interferencia de RNA (RNAi) (por ejemplo, RNA interferente corto (siRNA), microRNA (miRNA), RNAi dirigido por DNA (ddRNAi) y RNAi monocatenario (ssRNAi)) en sistemas de mamíferos. El RNAi se 55 refiere al proceso de inhibición postranscripcional de la expresión de genes mediante el uso de oligonucleótidos cortos que se diseñan para hibridar con objetivos de mRNA específicos (Fire y otros (1998) Nature 391:806-811; Zamore y otros (2000) Cell, 101:25-33). En el caso del siRNA, las moléculas de RNA bicatenario, cortas, utilizan la maquinaria enzimática celular para escindir moléculas de RNA objetivo homólogas. (Rana (2007) Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 8:23-36). Las tecnologías de RNAi bicatenario se basan en la administración o expresión de RNA bicatenario (dsRNA), que una vez dentro de la célula, se une por una enzima llamada dicer y se escinde en 21-23 nucleótidos. El complejo dicer-dsRNA resultante se administra e interactúa con un complejo que contiene Argonata de proteínas referido como complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Se cree que el RISC está presente en las células para descomponer catalíticamente moléculas de mRNA específicas. El dsRNA una vez unido mediante el RISC, se 60 desenrolla lo que resulta en un complejo ssRNA-RISC, que puede hibridarse con el mRNA objetivo. Una vez que se hibrida, el complejo RISC descompone el mRNA. En algunos casos, los procesos específicos de dsRNA de dicer se han

eludido mediante el uso de composiciones de RNAi monocatenario (ssRNAi) que interactúan directamente con el RISC para lograr la inhibición de la expresión de genes (Holen y otros (2003) *Nuc. Acids Res.* 31:2401-2407). A pesar que las tecnologías RNAi son capaces de unirse selectivamente al mRNA objetivo, se ha reconocido además, que dichas moléculas inducen estimulación inmune no específica a través de la interacción con el TLR3 (Kleinman y otros, (2008) *Nature* 452:591-597; De Veer et. al. (2005) *Immun. Cell Bio.* 83:224-228; Kariko y otros (2004) *J. Immunol.* 172:6545-6549). Esta activación inmune no específica ha originado dudas sobre la utilidad de las tecnologías RNAi como agentes farmacéuticos.

A pesar de que cada una de las tecnologías en base a el antisentido se han usado con cierto éxito, como resultado de basarse en oligonucleótidos, cada una de estas tecnologías tiene el problema inherente de ser inestable in vivo y tener el potencial de producir efectos fuera del objetivo, por ejemplo, la estimulación inmune no intencionada (Agrawal & Kandimalla (2004) *Nature Biotech.* 22:1533-1537). En el caso del dsRNA, éstos oligonucleótidos parecen tener el problema adicional de la administración ineficaz in vivo a las células (Medarova y otros (2007) *NatureMed.* 13:372-377). A pesar de los muchos ensayos clínicos de candidatas a fármacos de oligonucleótidos antisentido, solo uno de dichos compuestos ha sido aprobado como fármaco por la FDA. Este compuesto antisentido se aprobó para tratar el CMV, pero nunca se comercializó como producto. Además, ninguna ribozima o candidato de fármaco siRNA aún no se ha aprobado por la FDA.

Los enfoques para optimizar cada una de estas tecnologías se han centrado en abordar la bioestabilidad, el reconocimiento del objetivo (por ejemplo, la permeabilidad celular, la termoestabilidad) y la actividad in vivo. A menudo, éstos han representado consideraciones competitivas. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido tradicionales utilizaron enlaces internucleotídicos de éster de fosfato, que demostraron ser demasiado inestables biológicamente para ser eficaces. De este modo, hubo un enfoque en la modificación de los oligonucleótidos antisentido para hacerlos más estables biológicamente. Los primeros enfoques se centraron en modificar los enlaces internucleotídicos para hacerlos más resistentes a la degradación por nucleasas celulares. Estos enfoques condujeron al desarrollo de oligonucleótidos antisentido que tienen una variedad de enlaces internucleotídicos no naturales, tales como fosforotioato, metilfosfonato (Sarin y otros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:7448-7451), y enlaces en base a péptidos. (Matsukura y otros (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:7706; Agrawal y otros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:7079-7083; Miller (1991) *Bio-Technology* 9:358). Sin embargo, estas modificaciones causaron que las moléculas disminuyeran su especificidad objetivo y produjeran actividades biológicas no deseadas.

Enfoques posteriores para mejorar la estabilidad y conservar la especificidad y la actividad biológica utilizó oligonucleótidos de cadena principal mixtos que contienen enlaces internucleotídicos fosfodiéster y fosforotioato. Esta cadena principal mixta dio lugar a oligonucleótidos que conservaron o mejoraron su estabilidad biológica en comparación con los oligonucleótidos con enlaces fosfodiéster solamente (Agrawal y otros (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:1401-1405; Publicación de la Patente de Estados Unidos núm. 20010049436). A lo largo de la investigación de los oligonucleótidos, se ha reconocido que estas moléculas son susceptibles in vivo a la degradación por exonucleasas, y que la degradación primaria se produce a partir del extremo 3' de la molécula (Shaw y otros (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:747-750; Tamsamani y otros (1993) *Analytical Bioc.* 215:54-58). Mientras que, los enfoques para evitar esta actividad exonucleasa han utilizado (i) estructuras de remate en los extremos 5' y/o 3' (Tamsamani y otros (1992) *Ann. NY Acad. Sci.* 660:318-320; Tamsamani y otros (1993) *Antisense Res. Dev.* 3:277-284; Tang y otros (1993) *Nucl. Acids Res.* 20:2729-2735), (ii) enlaces de dos o más oligonucleótidos a través de enlaces 5'-3', 5'-2, 2'-3', 3'-2' o 3'-3' entre las moléculas (Agrawal y otros US6,489,464), (iii) oligonucleótidos auto hibridantes que se doblan sobre sí mismos en el extremo 3', lo que crea una horquilla y elimina el punto de acceso para que comience la actividad 3'-exonucleasa (Tang y otros (1993) *Nucl. Acids Res.* 20:2729-2735), o (iv) incorporar RNA en la molécula de oligonucleótido, creando de este modo una molécula híbrida de RNA/DNA (Metelev y otros (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:2929-2934; Metelev US 5,652,355; Metelev & Agrawal US 6,143,881; Metelev & Agrawal US 6,346,614; Metelev & Agrawal US 6,683,167, Metelev & Agrawal US 7,045,609).

Otros enfoques para mejorar la estabilidad y conservar la especificidad y la actividad biológica de los oligonucleótidos antisentido utilizaron la formación de triplex, oligonucleótidos de polipirimidina que se unen al DNA bicatenario u objetivos de RNA. Los oligonucleótidos de polipirimidina pueden unirse al DNA dúplex en la muesca principal a través de enlaces de hidrógeno de Hoogsteen y forman estructuras triplex que contienen una polipurina y dos cadenas de polipirimidina con tripletes de base T:A-T y C:G-C⁺ (Moser, H.E. and Dervan, P.B. (1987) *Science* 238, 645-650; Cooney, et al (1988) *Science* 241, 456-459). Los triplexes intramoleculares se forman además cuando las cadenas de homopurina y homopirimidina del DNA se fusionan y repliegan (Vasquez, K.M. and Wilson, J. H. (1998) *Trends Bioche. Sci.* 23, 4-9). La presencia de una tercer cadena introduce severas restricciones en la flexibilidad del DNA, cambiando su capacidad de reconocer proteínas específicas a lo largo de la muesca principal (Shields, G.C., y otros (1997) *Am. Chem. Soc.*, 119, 7463 -7469; Jimenez-Garcia, E., y otros (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 24640-24648, que resulta en una inhibición de la transcripción y, al final, la reducción de la expresión de genes. Los oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a la secuencia al DNA o RNA bicatenario pueden actuar como reguladores transcripcionales/traduccionales y ofrecer una estrategia prometedora de antígeno/antisentido para controlar la regulación de la expresión de genes (Giovannangeli, C. and Helene, C. (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 413; Giovannangeli, C., y otros (1996) *Biochemistry* 35, 10539; Maher, L.J., y otros (1992) *Biochemistry* 31, 70). Sin embargo, las condiciones para formar triplexes estables son problemáticas debido al reconocimiento limitado de las

bases y las condiciones de pH ácido no fisiológicas requeridas para la protonación de las citosinas en los oligonucleótidos formadores de triplex.

En un intento de formar tales triplexes estables, se han descrito los oligonucleótidos de polipirimidina con polaridad invertida unidos a través de un conector (es decir, una secuencia que tiene la polaridad 5'→3' seguida de otra secuencia con polaridad 3'→5', o viceversa)(Froehler, US5,399,676; Froehler US5,527,899; Froehler US5,721,218). En dichos oligonucleótidos de polaridad invertida, la secuencia en un lado de la inversión se une a la cadena de polipurina de un dúplex de acuerdo con el código de hélice triple y la secuencia en el otro lado se unirá al sitio de polipurina localizado adyacente en la cadena opuesta del dúplex (Diagrama 1A). De esta manera, el reconocimiento de la hélice triple puede extenderse por cambiar el reconocimiento de una cadena del dúplex a la otra y luego de nuevo, si se desea, y ese estiramiento de la secuencia objetivo está disponible. Además, éstos oligonucleótidos pueden formar además lazos D con el dúplex como se muestra en el Diagrama 1B. En esta situación, la región de la primera polaridad puede formar triplex, aunque la parte invertida desplaza una sección de una cadena del dúplex para dar lugar a un dúplex sustituto en la región relevante. Como los oligonucleótidos en sentido contrario son capaces de una actividad de unión dúplex significativa, éstos oligonucleótidos pueden ser útiles para inactivar la enfermedad que causa y el DNA o RNA indeseable que están en forma dúplex. Sin embargo, la composición de las moléculas está limitada a las secuencias de polipirimidina dirigidas a los sitios de polipurina del RNA o el DNA bicatenario.

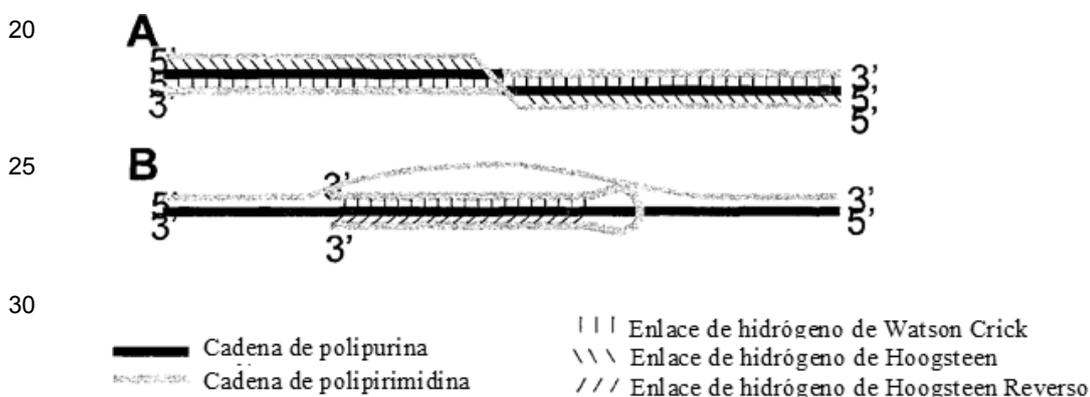


Diagrama 1. Formas de unión de los oligonucleótidos con polaridad invertida formas de Triplex en sentido contrario (A) y lazos D (B).

Alternativamente, se han desarrollado estrategias para dirigir el DNA y el RNA monocatenario mediante la formación de la hélice triple. Uno de los enfoques es dirigir las cadenas simples de DNA o RNA de polipirimidina con oligonucleótidos formadores de triplex de plegado con polaridad invertida (Kandimalla, E.R., y otros (1995) J. Am. Chem. Soc. 117, 6416-6417; Kandimalla, E.R., y Agrawal, S. (1996) Biochemistry 35, 15332). En tales oligonucleótidos formadores de triplex de plegado, se une un oligonucleótido de polipirimidina y su cadena de polipurina complementaria a través de la unión 3'-3' o la unión 5'-5'. Tales oligonucleótidos que contienen secuencias complementarias unidas a través de enlaces 3'-3' o 5'-5' forman dúplex de cadena paralelas a través de Hoogsteen o apareamiento de bases Hoogsteen inversa. Cuando una cadena de polipirimidina complementaria está disponible, forman estructuras helicoidales triples (Diagrama 2).

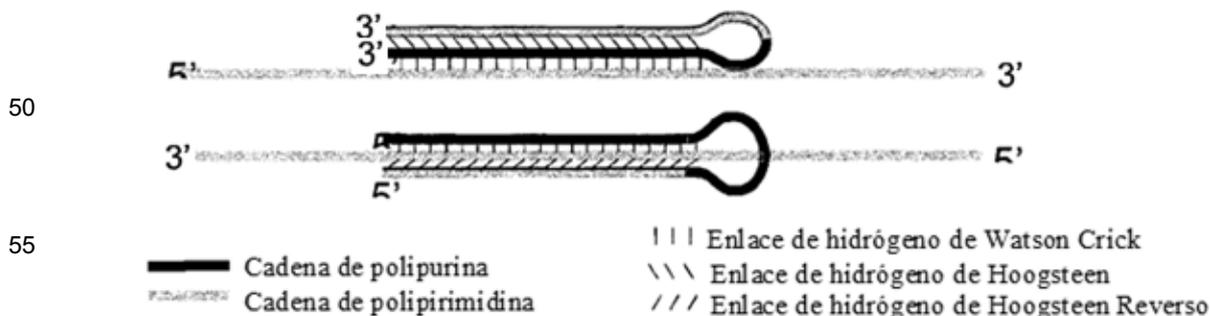


Diagrama 2. Formas de horquillas de cadenas paralelas de oligonucleótidos que contienen cadenas de purinas y pirimidinas unidas covalentemente ya sea al extremo 3'-3' o al 5'-5'

La patente núm. WO 2009/023819 A2 describe los antagonistas de oligonucleótidos del receptor Toll-like 9 (TLR9). La patente núm. WO 00/58330 A2 describe los oligonucleótidos pseudocíclicos que comprenden un oligonucleótido funcional y un oligonucleótido protector que es complementario al extremo terminal 3'- o 5'- del oligonucleótido funcional.

5 A pesar de los esfuerzos considerables, los esfuerzos para mejorar la estabilidad y conservar el reconocimiento del objetivo, sin efectos fuera del objetivo, no han producido generalmente oligonucleótidos que pudieran evidenciar la utilidad clínica. De este modo, las tecnologías en base al antisentido existentes dejan abierto el desafío de crear compuestos que sean estables biológicamente, específicos para el objetivo y eficaces inhibidores de la expresión de genes. Por lo tanto, se necesitan nuevos enfoques.

10

Breve resumen de la invención

15 El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones anexas. Se describen además los compuestos, las composiciones y los métodos útiles para modular la expresión de genes mediante el uso de compuestos basados en oligonucleótidos que comprenden dos o más oligonucleótidos antisentido monocatenarios que están unidos a través de sus extremos 5' para permitir la presencia de dos o más extremos 3' accesibles, que efectivamente inhiben o disminuyen la expresión de genes. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que dichos compuestos de oligonucleótidos son más eficaces que los oligonucleótidos antisentido no unidos.

20 Se describen, en un primer aspecto, compuestos basados en oligonucleótidos sintéticos nuevos que comprenden dos o más oligonucleótidos que son complementarios a una o más secuencias de mRNA, en donde los oligonucleótidos están unidos a través de sus extremos 5' para permitir la presencia de dos o más extremos 3' accesibles e hibridan específicamente para inhibir la expresión de una o más secuencias de mRNA.

25 Se describen además, en un segundo aspecto, composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender cualquier compuesto basado en oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con el primer aspecto en un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

30 Se describe además, en un tercer aspecto, un método para inhibir la expresión de genes, el método que comprende poner en contacto una célula con un compuesto basado en oligonucleótidos sintético de acuerdo con el primer aspecto.

35 Se describe además, en un cuarto aspecto, un método para inhibir la expresión de genes en un mamífero, el método que comprende administrar al mamífero un compuesto en base oligonucleótidos sintético de acuerdo con el primer aspecto.

40 Se describe además, en un quinto aspecto, un método para inhibir una respuesta mediada por el TLR, mediada por Bcl-2, mediada por EGFR, mediada por mdm2, mediada por MyD88, mediada por PCSK9, mediada por survivina o mediada por VEGF en un mamífero a través de la administración de un compuesto basado en oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con el primer aspecto, en donde, los oligonucleótidos son complementarios a una o más secuencias de ARNm de TLR, Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF.

45 Se describe además, en un sexto aspecto, un método para inhibir la respuesta mediada por el TLR, mediada por Bcl-2, mediada por EGFR, mediada por mdm2, mediada por MyD88, mediada por PCSK9, mediada por survivina o mediada por VEGF en un mamífero aunque la administración de un compuesto basado en oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con el primer aspecto, en donde, los oligonucleótidos son complementarios a una o más secuencias de mRNA de TLR, Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF en combinación con un antagonista de la actividad de la proteína del TLR, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF.

50 Se describen además, en un séptimo aspecto, los métodos para inhibir la expresión de genes en un mamífero, tales métodos que comprenden administrar al mamífero un compuesto basado en oligonucleótidos descrito en la presente. En algunas modalidades, el mamífero es un humano. En algunas modalidades preferidas, el compuesto basado en oligonucleótidos se administra a un mamífero que necesita inhibir su respuesta inmune.

55 Se describen además, en un octavo aspecto, los métodos para tratar terapéuticamente a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, tales métodos comprenden, administrar al paciente un compuesto basado en oligonucleótidos descrito en la presente, en una cantidad eficaz terapéuticamente. En diferentes modalidades, la enfermedad o el trastorno a tratar es el cáncer, un trastorno autoinmune, enfermedad infecciosa, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, trastorno de la piel, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen, sin limitarse a, bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

60

Se describen además, en un noveno aspecto, los métodos para prevenir una enfermedad o trastorno, tales métodos comprenden, administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o el trastorno un compuesto basado en oligonucleótido descrito en la presente en una cantidad efectiva farmacéuticamente. En diferentes modalidades, la enfermedad o el trastorno que se previene es el cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias,

trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen, sin limitarse a, bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

5 Se describe además, en un décimo aspecto, un método para prevenir o tratar un trastorno, tal método comprende aislar las células capaces de producir citocinas o quimiocinas que incluyen, pero no se limitan a, células inmunes, células T reguladoras, células B, PBMCs, pDCs y células linfoides; cultivar tales células en condiciones de cultivo celular estándar, tratar dichas células ex vivo con un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto, tal que las células aisladas produzcan o secreten niveles disminuidos de citoquinas o quimiocinas y administrar o readministrar las células tratadas a un paciente que necesita terapia para inhibir citocinas y/o quimiocinas para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad. Este aspecto estaría de acuerdo con las técnicas de inmunoterapia celular adoptiva estándar para producir células inmunes activadas.

15 Se describe además, en un undécimo aspecto, una composición que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto y una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos (tanto quimioterapia tradicional como terapias dirigidas modernas), inhibidores de quinasas, alérgenos, antibióticos, agonistas, antagonistas, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de RNAi, moléculas de siRNA, moléculas de miRNA, aptámeros, proteínas, vectores de terapia de genes, vacunas de DNA, adyuvantes, moléculas coestimuladoras o las combinaciones de éstos.

20 Breve descripción de los dibujos

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

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

30 Las Figuras 2A y 2B representan la actividad antisentido de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención en células HEK293 que expresan el TLR9 murino. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido, de acuerdo con la invención, para inhibir la actividad agonista del TLR9 en células cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

35 La Figura 2C representa la actividad antisentido de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, en células HEK293 que expresan el TLR7 murino. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido, de acuerdo con la invención, para inhibir la actividad agonista del TLR7 en células cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

40 La Figura 2D representa la actividad antisentido de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, en células HEK293 que expresan MyD88 murino. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, para inhibir la actividad agonista de MyD88 en células cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

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

50 La Figura 4 representa la actividad antisentido de oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención en PBMCs humanas. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, para inhibir la traducción del mRNA del TLR9, o la síntesis de proteínas, en PBMCs humanas tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

55 Las Figuras 5A y 5B representan la actividad de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, para inhibir la IL12 inducida por el TLR9 después de la administración in vivo de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración de un oligonucleótido antisentido del TLR9 ejemplar de acuerdo con la invención, puede provocar una regulación negativa de la expresión del TLR9 in vivo e impedir la inducción de la IL12 por un agonista del TLR9. Generalmente, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido antisentido del TLR9 de acuerdo con la invención, para inhibir la inducción de citocinas proinflamatorias por un agonista del TLR9.

60 La Figura 5C describe la duración de la actividad in vivo de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, para inhibir la IL12 inducida por MyD88 después de la administración in vivo de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración de un oligonucleótido antisentido MyD88 ejemplar de acuerdo con la invención, puede provocar una regulación negativa de la expresión de MyD88 in vivo e impedir la inducción de la IL12 por un agonista del TLR9 durante una duración más larga ya sean los oligonucleótidos antisentido lineales u oligonucleótidos antisentido unidos 3'-3'. Generalmente, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido

antisentido MyD88 de acuerdo con la invención, para inhibir la inducción de citocinas proinflamatorias por un agonista del TLR.

5 La Figura 6 representa la actividad de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, para inhibir la IL12 inducida por el TLR9 de una manera dependiente de la dosis después de la administración in vivo de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración in vivo de un oligonucleótido antisentido del TLR9 de acuerdo con la invención, puede provocar una regulación negativa de la expresión del TLR9 in vivo de una manera dependiente de la dosis y prevenir la inducción de la IL12 por un agonista del TLR9. Generalmente, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido antisentido del TLR9 de acuerdo con la invención, para inhibir selectivamente la inducción de citocinas proinflamatorias por un agonista del TLR9.

15 La Figura 7 representa la actividad de oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, para inhibir la IL12 inducida por el TLR9 de una manera dependiente del tiempo después de la administración in vivo de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración in vivo de un oligonucleótido antisentido del TLR9 de acuerdo con la invención, puede provocar una regulación negativa de la expresión del TLR9 in vivo de una manera dependiente del tiempo y prevenir la inducción de la IL12 por un agonista del TLR9 durante un período de tiempo prolongado. Generalmente, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido antisentido del TLR9 de acuerdo con la invención, para inhibir la inducción de citocinas proinflamatorias por un agonista del TLR9 de una manera dependiente del tiempo.

20 Las Figuras 8A, 8B, 8C representan la actividad antisentido de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, en células J774 murinas. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, para inhibir el mRNA del TLR9, la transcripción, la traducción o la síntesis de proteínas, en las células murinas J774 tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

25 La Figura 8D representa la actividad antisentido de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, en células HeLa humanas. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, para inhibir la transcripción del mRNA de VEGF en células HeLa humanas tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

30 La Figura 9 representa la actividad antisentido de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, en células B humanas. Los datos demuestran la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, para inhibir la traducción del mRNA del TLR9 o la síntesis de proteínas en células B humanas tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2.

35 La Figura 10 representa la actividad antisentido de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, en pDCs humanos. Los datos demuestran capacidad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, para inhibir la traducción del mRNA del TLR9, o la síntesis de proteínas, en pDCs humanos tratados de acuerdo con el Ejemplo 2.

40 La Figura 11 representa la actividad de los oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención, para inhibir la IL12 inducida por el TLR9 después de la administración in vivo de acuerdo con el Ejemplo 3. Los datos demuestran que la administración in vivo de un oligonucleótido antisentido del TLR9 ejemplar de acuerdo con la invención, puede provocar una regulación negativa de la expresión del TLR9 in vivo e impedir la inducción de la IL12 por un agonista del TLR9. Generalmente, los datos demuestran la capacidad de un oligonucleótido antisentido del TLR9 de acuerdo con la invención, para inhibir la inducción de citocinas proinflamatorias por un agonista del TLR9.

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

50 La Figura 13 representa la unión selectiva y la escisión de oligonucleótidos antisentido ejemplares de acuerdo con la invención tratados de acuerdo con el Ejemplo 4. En la Figura 13, el Carril 1 es el sustrato solo; el Carril 2 es la nucleasa T1; el carril 3 es 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3' (sec. con núm. de ident. 28); el Carril 4 es 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-X-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-5'; el Carril 5 es 3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3' (sec. con núm. de ident. 21); el Carril 6 es 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3'; el Carril 7 es 5'-CUGUCoAoAoAoUoGoCoUoUoGoUoCoAoGoUoCoCoACGAU-3' (sec. con núm. de ident. 29); el Carril 8 es dsRNA; y el Carril 9 es DNA antisentido de 20 mer; en donde, todas las secuencias tienen cadena de fosforotioato excepto donde se indica con una "o" (enlace fosfodiéster); los nucleótidos subrayados indican 2'-O-metilribonucleótidos. Los datos demuestran que los oligonucleótidos de acuerdo con la invención, proporcionan una estructura óptima para la unión y la escisión por proteínas y enzimas asociadas con la inhibición mediada por RNAi de la expresión de genes.

65

Descripción detallada de las modalidades preferidas

- 5 La invención se relaciona con el uso terapéutico y profiláctico de los oligonucleótidos antisentido nuevos para la regulación negativa de la expresión de genes. Tales moléculas son útiles, por ejemplo, para proporcionar composiciones para la modulación de la expresión de genes o para tratar y/o prevenir enfermedades y/o afecciones que sean capaces de responder a la modulación de la expresión de genes en pacientes, sujetos, animales u organismos.
- 10 Las patentes y publicaciones citadas en la presente reflejan el nivel del conocimiento en la técnica. Cualquier conflicto entre las enseñanzas de estas patentes y las publicaciones y esta especificación se resolverá a favor de este último.
- 15 Los objetos de la presente invención, las características diferentes de éstos, así como la invención en sí misma, pueden entenderse más completamente a partir de la siguiente descripción, cuando se leen junto con las figuras adjuntas, en los que los siguientes términos tienen el significado atribuido.
- 20 El término "2'-O-sustituido" significa la sustitución de la posición 2' de la porción de la pentosa con un grupo alquilo inferior -O- que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados (por ejemplo, pero sin limitarse a, 2'-O-metilo), o con un grupo -O-arilo o alilo que tiene 2-6 átomos de carbono, en donde dicho grupo alquilo, arilo o alilo puede estar no sustituido o puede estar sustituido, (por ejemplo, con grupos 2'-O-metoxietilo, etoxi, metoxi, halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carbalcoxilo o amino); o con un grupo hidroxilo, amino o halo, pero no con un grupo 2'-H. En algunas modalidades, los oligonucleótidos de la invención incluyen cuatro o cinco nucleótidos de 2'-O-alquilo en su extremo 5', y/o cuatro o cinco nucleótidos de 2'-O-alquilo en su terminal 3'.
- 25 El término "3' ", cuando se usa direccionalmente, se refiere generalmente a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 3'(hacia el extremo 3' del nucleótido) desde otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.
- 30 El término "extremo 3' " se refiere generalmente al terminal 3' de los oligonucleótidos componentes. "Dos o más oligonucleótidos unidos en sus extremos 3' "se refiere generalmente a un enlace entre los nucleótidos del terminal 3' de los oligonucleótidos que pueden estar directamente a través de grupos hidroxilo 5', 3' o 2', o indirectamente, a través de un enlace no nucleotídico. Tales enlaces pueden ser además a través de un nucleósido, utilizando ambas posiciones hidroxilo 2' y 3' del nucleósido. Tales enlaces pueden utilizar además un azúcar funcionalizado o nucleobase de un nucleótido terminal 3'.
- 35 El término "5' ", cuando se usa direccionalmente, se refiere generalmente a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 5'(hacia el extremo 5' del nucleótido) desde otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.
- 40 El término "extremo 5' " se refiere generalmente al nucleótido terminal 5' de los oligonucleótidos componentes. "Dos o más oligonucleótidos antisentido monocatenarios unidos en sus extremos 5' " se refieren generalmente a un enlace entre los nucleótidos terminales 5' de los oligonucleótidos que pueden estar directamente a través de grupos hidroxilo 5', 3' o 2', o indirectamente, a través de un conector no nucleotídico. Tales enlaces pueden ser además a través de un nucleósido, utilizando ambas posiciones hidroxilo 2' y 3' del nucleósido. Tales enlaces pueden utilizar además un azúcar funcionalizado o nucleobase de un nucleótido terminal 5'.
- 45 El término "aproximadamente" significa generalmente que el número exacto no es crítico. De este modo, los oligonucleótidos que tienen uno o dos residuos de nucleósidos menos, o de uno a varios residuos de nucleósidos adicionales se contemplan como equivalentes de cada una de las modalidades descritas anteriormente.
- 50 El término "accesible" significa generalmente cuando se relaciona con un compuesto de acuerdo con la invención, que la parte relevante de la molécula puede reconocerse por los componentes celulares necesarios para provocar una respuesta pretendida al compuesto.
- 55 } El término "agonista" se refiere generalmente a una sustancia que se une a un receptor de una célula e induce una respuesta. Un agonista a menudo imita la acción de una sustancia de origen natural, como un ligando.
- El término "antagonista" se refiere generalmente a una sustancia que atenúa los efectos de un agonista o ligando.
- 60 El término "inflamación de las vías respiratorias" incluye generalmente, sin limitarse a, la inflamación en el tracto respiratorio causada por alérgenos, que incluye el asma.
- 65 El término "alérgeno" se refiere generalmente a un antígeno o porción antigénica de una molécula, una proteína normalmente, que provoca una respuesta alérgica tras la exposición a un sujeto. Típicamente, el sujeto es alérgico al alérgeno, como se indica, por ejemplo, por la prueba de roncha y reflejo o cualquier método conocido en la técnica. Una molécula se dice que es un alérgeno, incluso si solo un pequeño subconjunto de sujetos presenta una respuesta inmune alérgica (por ejemplo, IgE) tras la exposición a la molécula.

El término "alergia" incluye generalmente, sin limitarse a, alergias a los alimentos, alergias respiratorias y alergias en la piel.

5 El término "antígeno" se refiere generalmente a una sustancia que se reconoce y se une selectivamente por un anticuerpo o por un receptor de antígeno de células T. Los antígenos pueden incluir, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, lípidos, carbohidratos, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos y las combinaciones de éstos. Los antígenos pueden ser naturales o sintéticos e inducen generalmente una respuesta inmune específica para ese antígeno.

10

El término "trastorno autoinmune" se refiere generalmente a trastornos en los cuales el antígeno "auto" se somete a un ataque del sistema inmunitario. Dicho término incluye, sin limitarse a, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Chron, artritis reumatoide, shock séptico, alopecia universal, encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, penfigoideampolloso, enfermedad de Chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de hidro, dermatomiositis, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain Barré, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, trombocitopenia púrpura idiopática, cistitis intersticial, morfea, miastenia gravis, narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, esquizofrenia, síndrome de Sjögren, arteritis temporal ("arteritis de células gigantes"), vasculitis, vitiligo, vulvodinia y granulomatosis de Wegener, asma autoinmune, shock séptico y psoriasis.

15

20

El término "inestabilidad biológica" se refiere generalmente a la capacidad de una molécula para degradarse y subsiguientemente inactivarse in vivo. Para los oligonucleótidos, dicha degradación resulta de la actividad de la exonucleasa y/o de la actividad de la endonucleasa, en donde la actividad de la exonucleasa se refiere a la escisión de nucleótidos del extremo 3' o 5' de un oligonucleótido, y la actividad de la endonucleasa se refiere a la escisión de los enlaces fosfodiéster en posiciones distintas a los extremos del oligonucleótido.

25

30

El término "cáncer" se refiere generalmente, sin limitarse a, cualquier crecimiento o tumor maligno causado por la proliferación y/o la división celular anormal o no controlada. El cáncer puede aparecer en humanos y/o mamíferos y pueden surgir en todos y cada uno de los tejidos. El tratamiento de un paciente que tiene cáncer puede incluir la administración de un compuesto, la formulación farmacéutica o vacuna de acuerdo con la invención, de manera que se afecta la proliferación y/o la división celular anormal o no controlada, o la metástasis.

35

El término "portador" incluye generalmente cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizante, solubilizante, aceite, lípido, vesícula que contiene lípidos, microesferas, encapsulación liposomal u otro material para usarse en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del portador, excipiente o diluyente dependerán de la vía de administración para una aplicación particular. La preparación de formulaciones aceptables farmacéuticamente que contienen éstos materiales se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

40

45

El término "coadministración" o "coadministrado" se refiere generalmente a la administración de al menos dos sustancias diferentes suficientemente cercanas en el tiempo para modular una respuesta inmune. La coadministración se refiere a la administración simultánea, así como a un orden temporal espaciado de hasta varios días de diferencia, de al menos dos sustancias diferentes en cualquier orden, ya sea en una dosis única o en dosis separadas.

50

El término "en combinación con" significa generalmente administrar una composición en base a oligonucleótidos de acuerdo con la invención y otro agente útil para tratar la enfermedad o condición que no elimina la actividad del compuesto en el curso del tratamiento de un paciente. Dicha administración puede realizarse en cualquier orden, que incluye la administración simultánea, así como ordenada por espacio temporalmente de algunos segundos hasta varios días de diferencia. Tal tratamiento de combinación puede incluir además más de una sola administración del compuesto de acuerdo con la invención y/o independientemente del otro agente. La administración del compuesto de acuerdo con la invención y el otro agente puede ser por la misma o por diferentes vías.

55

El término "individuo" o "sujeto" o "paciente" se refiere generalmente a un mamífero, como un humano.

60

El término "inhibidor de la quinasa" se refiere generalmente a moléculas que antagonizan o inhiben la señalización celular dependiente de la fosforilación y/o las vías de crecimiento en una célula. Los inhibidores de la quinasa pueden ser de origen natural o sintéticos e incluyen moléculas pequeñas que tienen el potencial de administrarse como terapéuticos orales. Los inhibidores de la quinasa tienen la capacidad de inhibir rápida y específicamente la activación de las moléculas de la quinasa objetivo. Las proteínas quinasas son objetivos de fármacos atractivos, en parte porque regulan una amplia variedad de vías de señalización y el crecimiento e incluyen muchas proteínas diferentes. Mientras que, tienen un gran potencial en el tratamiento de enfermedades que implican la señalización de la quinasa, que incluyen el cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos inflamatorios, diabetes, degeneración macular y trastornos neurológicos. Un ejemplo no limitante de un inhibidor de la quinasa es el sorafenib.

65

- El término "síntesis lineal" se refiere generalmente a una síntesis que comienza en un extremo de un oligonucleótido y progresa linealmente hacia el otro extremo. La síntesis lineal permite la incorporación de unidades monoméricas idénticas o no idénticas (en términos de longitud, composición base y/o modificaciones químicas incorporadas) en un oligonucleótido.
- 5 El término "mamífero" está expresamente destinado a incluir animales vertebrados de sangre caliente, que incluyen, sin limitarse a, humanos, primates no humanos, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado vacuno, cerdos, ovejas y conejos.
- 10 El término "nucleósido" se refiere generalmente a compuestos que consisten en un azúcar, generalmente ribosa, desoxirribosa, pentosa, arabinosa o hexosa, y una base de purina o pirimidina.
- El término "nucleótido" se refiere generalmente a un nucleósido que comprende un grupo que contiene fósforo unido al azúcar.
- 15 El término "nucleósido modificado" o "derivado de nucleótido" generalmente es un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, una porción del azúcar modificado o cualquier combinación de éstos. En algunas modalidades, el nucleósido modificado o el derivado de nucleótido es un nucleósido de pirimidina o purina no natural, como se describe en la presente. A los fines de la invención, puede usarse indistintamente el nucleósido modificado o el derivado de nucleótido, un análogo de pirimidina o purina o pirimidina o purina que no se produce naturalmente y se refiere a un nucleósido que incluye una base que no se produce naturalmente y/o una porción de azúcar que no se produce naturalmente. A los fines de la invención, una base se considera que no es natural si no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo y un azúcar se considera no natural si no es β -ribo-furanosido o 2'-deoxiribo-furanosido.
- 20 El término "oligonucleótido modificado", como se utiliza en la presente descripción, describe un oligonucleótido en el que al menos dos de sus nucleótidos están unidos covalentemente a través de un enlace sintético, es decir, un enlace distinto de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido en el que el fosfato del nucleótido 5' se ha reemplazado con cualquier cantidad de grupos químicos. El término "oligonucleótido modificado" incluye además ácidos nucleicos 2'-O, 4'-C-metileno-b-D-ribofuranosilo, ácidos nucleicos de arabinosa, ácidos nucleicos de arabinosa sustituidos, ácidos nucleicos de hexosa, ácidos nucleicos peptídicos, morfolino y oligonucleótidos que tienen al menos un nucleótido con una base y/o azúcar modificada, tal como un 2'-O-sustituido, una 5-metilcitosina y/o un ribonucleótido 3'-O-sustituido.
- 25 El término "ácido nucleico" incluye una región genómica o una molécula de RNA transcrita a partir de ella. En algunas modalidades, el ácido nucleico es mRNA.
- 30 El término "conector" se refiere generalmente a cualquier porción que puede unirse a un oligonucleótido por medio de un enlace covalente o no covalente a través de un azúcar, una base o la cadena principal. El enlace no covalente puede ser, sin limitarse a, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, interacciones de apilamiento π , enlaces de hidrógeno y las combinaciones de éstos. Los ejemplos no limitantes de este enlace no covalente incluyen el apareamiento de bases Watson Crick, el apareamiento de bases Hoogsteen y el apilamiento de bases. El conector puede usarse para unir dos o más nucleósidos o puede unirse al nucleótido terminal 5' y/o 3' en el oligonucleótido. Dicho conector puede ser un conector no nucleotídico o un conector nucleósido.
- 35 El término "conector no nucleotídico" se refiere generalmente a una porción química, que no es un enlace directamente entre dos nucleótidos que pueden unirse a un oligonucleótido mediante enlace covalente o no covalente. Preferentemente, dicho conector no nucleotídico es de aproximadamente 2 angstroms a aproximadamente 200 angstroms de longitud, y puede estar en una orientación cis o trans.
- 40 El término "enlace internucleotídico" se refiere generalmente a un enlace químico para unir dos nucleósidos a través de sus azúcares (por ejemplo, 3'-3', 2'-3', 2'-5', 3'-5', 5'-5') que consiste en un átomo de fósforo y un grupo cargado o neutral (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato o metilfosfonato) entre nucleósidos adyacentes.
- 45 El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleósido formado a partir de una pluralidad de unidades nucleósidas unidas, que pueden incluir, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, nucleótidos sintéticos o naturales, fosfodiéster o enlaces modificados, bases naturales o bases modificadas, azúcares naturales o azúcares modificados, o las combinaciones de éstos componentes. Las unidades nucleósidas pueden ser parte de virus, bacterias, restos celulares o composiciones en base a oligonucleótidos (por ejemplo, siRNA y microRNA). Tales oligonucleótidos pueden obtenerse además a partir de fuentes de ácido nucleico existentes, que incluyen la genómica o cDNA, pero se producen preferentemente mediante métodos sintéticos. En ciertas modalidades, cada unidad de nucleósido incluye una base heterocíclica y una pentofuranosilo, trehalosa, arabinosa, nucleósido sustituido 2'-desoxi-2', arabinosa sustituida 2'-desoxi-2', arabinosa sustituida 2'-O o un grupo de azúcar hexosa. Los residuos de nucleósido pueden acoplarse entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces internucleosídicos conocidos. Tales enlaces de internucleósidos incluyen, sin limitarse a, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter,
- 50
55
60
65

- fosforamidato de unión, metilfosfonato de unión, fosforotioato de unión y enlaces internucleósidos de sulfona. El término "oligonucleótido" incluye además polinucleósidos que tienen uno o más enlaces internucleosídicos estereoespecíficos (por ejemplo, enlaces (*R_P*)- o (*S_P*)- fosforotioato, alquilfosfonato o fosfotriéster). Como se utiliza en la presente descripción, los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" están expresamente destinados a incluir polinucleósidos y dinucleósidos que tienen cualquier enlace internucleósido, que comprenden o no un grupo fosfato. En ciertas modalidades ejemplares, éstos enlaces internucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato, o las combinaciones de éstos. En modalidades ejemplares, los nucleótidos de los oligonucleótidos sintéticos están unidos por al menos un enlace internucleotídico fosforotioato. Los enlaces fosforotioato pueden ser enantiómeros *R_P* y *S_P* mixtos, o pueden ser estereo regulares o estereo regulares sustancialmente en cualquiera de las formas *R_P* o *S_P* (ver, Iyer y otros (1995) *Tetrahedron Asymmetry* 6:1051-1054). En ciertas modalidades, uno o más de los oligonucleótidos dentro de las composiciones antisentido de la invención, contienen uno o más ácidos nucleicos 2'-0,4'-C-metileno-b-D -ribofuranosilo, en donde, la ribosa se modifica con un enlace entre los carbonos 2' y 4', que fija la ribosa en la conformación estructural 3'-endo.
- La frase "un oligonucleótido que es complementario a una secuencia de RNA monocatenario" y similares, significan que el oligonucleótido forma un número suficiente de enlaces de hidrógeno a través de las interacciones de Watson Crick de sus nucleobases con nucleobases de la secuencia de RNA monocatenario para formar una doble hélice con la secuencia de RNA monocatenario bajo condiciones fisiológicas. Esto está en contraste con los oligonucleótidos que forman una triple hélice con un DNA o RNA bicatenario a través del enlace de hidrógeno Hoogsteen.
- El término "complementario" pretende significar un oligonucleótido que se une a la secuencia de ácido nucleico bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, mediante el apareamiento de bases de Watson Crick (interacción entre el oligonucleótido y el ácido nucleico monocatenario) o mediante el apareamiento de bases de Hoogsteen (interacción entre el oligonucleótido y el ácido nucleico bicatenario) o por cualquier otro medio, que incluye en el caso de un oligonucleótido, la unión al RNA y causa la formación de pseudoknot. La unión por Watson Crick o el apareamiento de bases de Hoogsteen bajo condiciones fisiológicas se mide como una cuestión práctica observando la interferencia con la función de la secuencia de ácido nucleico.
- El término "péptido" se refiere generalmente a oligómeros o polímeros de aminoácidos que son de longitud y composición suficientes para afectar a una respuesta biológica, por ejemplo, la producción de anticuerpos o la actividad de citocinas, ya sea o no el péptido un hapteno. El término "péptido" puede incluir aminoácidos modificados (ya sean o no de origen natural), donde dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación, glicosilación, pegilación, lipidización y metilación.
- El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de un compuesto de acuerdo con la invención o la actividad biológica de un compuesto de acuerdo con la invención.
- El término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Preferentemente, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un mamífero, particularmente un ser humano.
- El término "cantidad efectiva profilácticamente" se refiere generalmente a una cantidad suficiente para prevenir o reducir el desarrollo de un efecto biológico no deseado.
- El término "cantidad efectiva terapéuticamente" o "cantidad efectiva farmacéuticamente" se refiere generalmente a una cantidad suficiente para afectar el efecto biológico deseado, tal como un resultado beneficioso, que incluye, sin limitarse a, la prevención, disminución, mejora o eliminación de los signos o síntomas de una enfermedad o trastorno. De este modo, la cantidad total de cada componente activo de la composición o método farmacéutico es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, pero sin limitarse a, la curación de condiciones crónicas caracterizadas por la estimulación inmune. De este modo, una "cantidad efectiva farmacéuticamente" dependerá del contexto en el que se administre. Una cantidad efectiva farmacéuticamente puede administrarse en una o más administraciones profilácticas o terapéuticas. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto terapéutico, ya sea administrado en combinación, en serie o simultáneamente.
- El término "tratamiento" se refiere generalmente a un enfoque destinado a obtener un resultado beneficioso o deseado, que puede incluir aliviar los síntomas o retrasar o mejorar la progresión de la enfermedad.
- El término "expresión de genes" se refiere generalmente al proceso mediante el cual se usa la información de un gen en la síntesis de un producto génico funcional, que puede ser una proteína. El proceso puede implicar la transcripción, el empalme del RNA, la traducción y la modificación postraduccional de una proteína, y puede incluir mRNA, preRNA, RNA ribosomal y otros moldes para la síntesis de proteínas.

En un primer aspecto, la invención proporciona compuestos basados en oligonucleótidos nuevos que comprenden dos oligonucleótidos antisentido monocatenarios unidos en sus extremos 5', en donde los compuestos tienen dos extremos 3' accesibles. El enlace en los extremos 5' de los oligonucleótidos componentes es independiente de los otros enlaces oligonucleotídicos y puede estar directamente a través de grupos hidroxilo 5', 3' o 2', o indirectamente, a través de un conector no nucleotídico o un nucleósido, utilizando cualquiera las posiciones hidroxilo 2 'o 3' del nucleósido. Los enlaces pueden utilizar además un azúcar funcionalizado o nucleobase de un nucleótido terminal 5'.

Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención, comprenden dos secuencias idénticas o diferentes conjugadas en sus extremos 5'-5' a través de un conector fosfodiéster, fosforotioato o no nucleósido (Diagrama 3). Dichos compuestos comprenden de 15 a 27 nucleótidos que son complementarios a porciones específicas de objetivos de mRNA de interés para la regulación negativa antisentido del producto génico. Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención que comprenden secuencias idénticas son capaces de unirse a un mRNA específico mediante interacciones de enlace de hidrógeno de Watson Crick e inhibir la expresión de la proteína (Diagrama 3). Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención que comprenden diferentes secuencias son capaces de unirse a dos o más regiones diferentes de uno o más objetivos de mRNA e inhibir la expresión de la proteína. Tales compuestos se componen de secuencias de heteronucleótidos complementarias al mRNA objetivo y forman estructuras dúplex estables a través de enlaces de hidrógeno de Watson Crick. Sorprendentemente, dichas secuencias que contienen dos extremos 3' libres (antisentido unido a los 5'-5') son inhibidores de la expresión de genes más potentes que aquellos que contienen un sólo extremo 3' libre o un extremo 3' no libre.

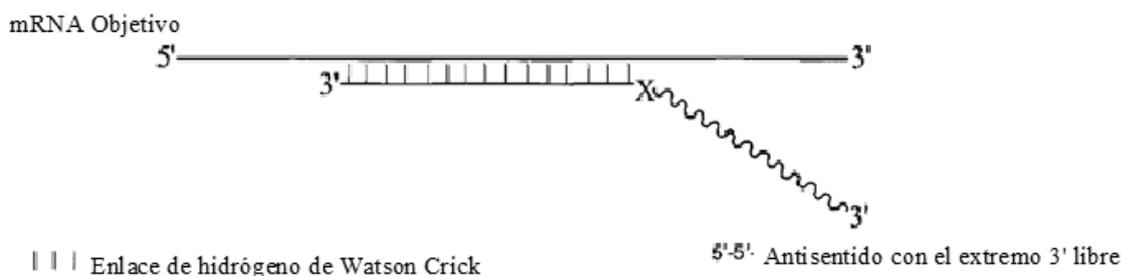


Diagrama 3. Forma antisentido de unión de los compuestos en base a oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

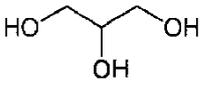
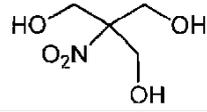
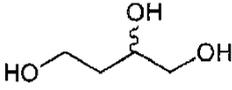
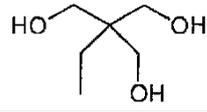
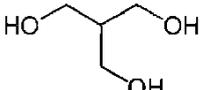
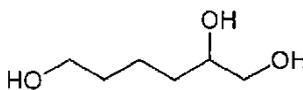
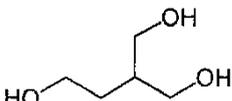
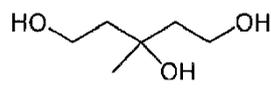
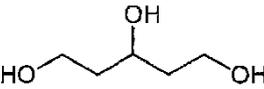
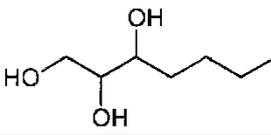
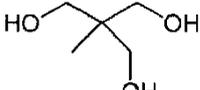
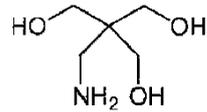
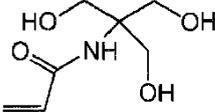
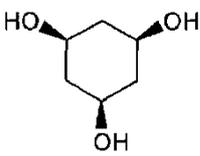
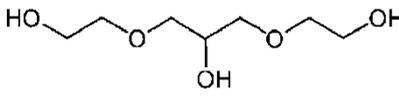
Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención, son útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, en donde, la inhibición de una expresión de genes sería beneficiosa. Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos antisentido que comprenden nucleótidos de origen natural, nucleótidos modificados, oligonucleótidos modificados y/o oligonucleótidos modificados de cadena principal. Sin embargo, los oligonucleótidos antisentido que inhiben la traducción de proteínas codificadas por mRNA pueden producir efectos biológicos indeseados, que incluyen pero no se limitan a, la actividad antisentido insuficiente, biodisponibilidad inadecuada, farmacocinética o farmacodinámica subóptima, estimulación inmune no intencionada, actividad fuera del objetivo e inestabilidad biológica. El diseño óptimo de un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención requiere muchas consideraciones más allá del diseño simple de una molécula que es complementaria a la secuencia de RNA objetivo. De este modo, la preparación de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención tiene la intención de incorporar los cambios necesarios para limitar la interferencia de la estructura secundaria con la actividad antisentido, mejorar la especificidad objetivo del oligonucleótido, minimizar la interacción con factores de unión o competitivos (por ejemplo, proteínas), optimizar la absorción celular, la biodisponibilidad, la farmacocinética y la farmacodinámica y/o inhibir, prevenir o suprimir la activación de las células inmunes.

La estructura general de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención puede describirse mediante la siguiente fórmula.



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

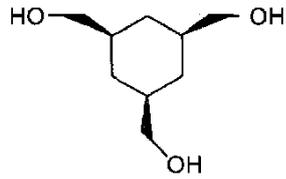
Tabla 1: Conectores No Nucleotídicos Representativos

5		
	Glicerol (1,2,3-Propanetriol)	1,1,1-Tris(hidroximetil) nitrometano
10		
15	1,2,4-Butanetriol	1,1,1-Tris(hidroximetil)propano
20		
	2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol	1,2,6-Hexanetriol
25		
	2-(hidroximetil) 1,4-butanodiol	3-Metil-1,3,5-pentanetriol
30		
35	1,3,5-Pentanetriol	1,2,3-Heptanetriol
40		
	1,1,1-Tris(hidroximetil)etano	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
45		
		N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida
50		
55	cis-1,3,5-Ciclohexanetriol	1,3-Di(hidroxi-etoxi)-2-hidroxilpropano

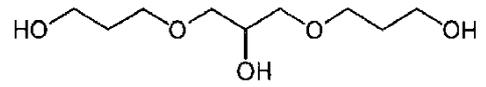
60

65

5

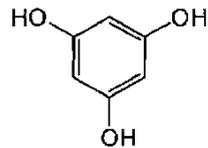


cis-1,3,5-Tri(hidroximetil)ciclohexano

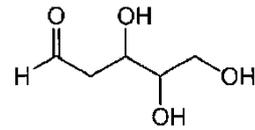


1,3-Di(hidroxiopropoxi)-2-hidroxiopropano

10



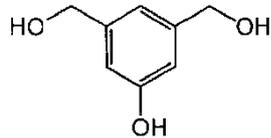
1,3,5,-Trihidroxi-benceno



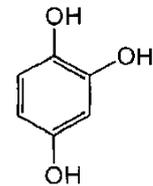
2-Desoxi-D-ribosa

15

20



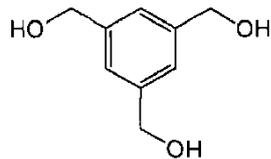
3,5,-Di(hidroximetil)fenol



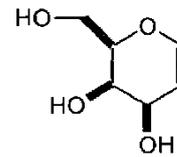
1,2,4-Trihidroxi-benceno

25

30



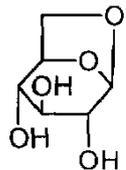
1,3,5,-Tri(hidroximetil)benceno



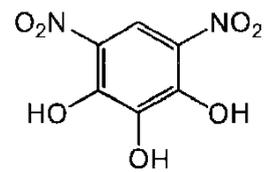
D-Galactool

35

40



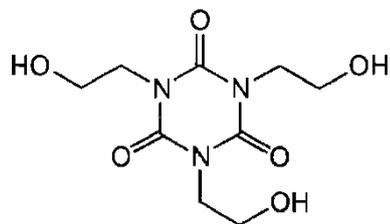
1,6-anhidro-β-D-Glucosa



4,6-Nitropirogalol

45

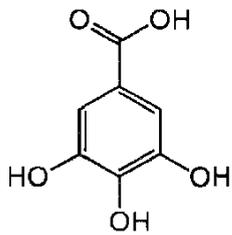
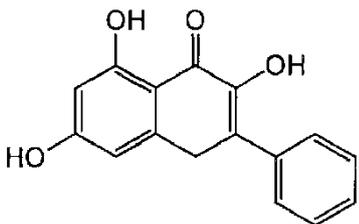
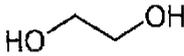
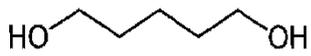
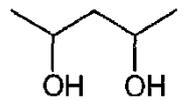
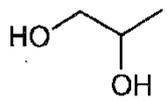
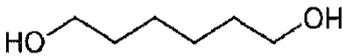
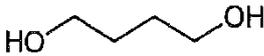
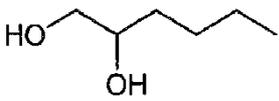
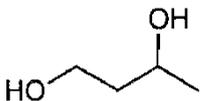
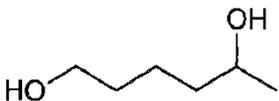
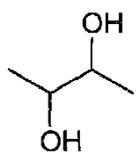
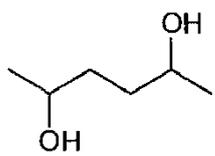
50



1,3,5-Tris(2-hidroxi-etil)-Ácido cianúrico

55

60

5		
10	Ácido gálico	
15		
20	3,5,7-Trihidroxiflavona	
25		
	Etilenglicol	1,5-Pentanodiol
30		
35	1,3-Propanodiol	2,4-Pentanodiol
40		
45	1,2-Propanodiol	1,6-Hexanodiol
50		
55	1,4-Butanodiol	1,2-Hexanodiol
60		
	1,3-Butanodiol	1,5-Hexanodiol
60		
	2,3-Butanodiol	2,5-Hexanodiol

5		
	1,4-Butanodiol	
10		
	1,7-Heptanodiol	
15		2-(1-Aminopropil)-1,3-propanodiol
	1,8-Octanodiol	
20		
	1,2-Octanodiol	
25		1,2-Dideoxirribosa
	1,9-Nonanodiol	
30		
	1,12-Dodecanodiol	
35		
	Trietilenglicol	
40		
	Tetraetilenglicol	
45		
	Hexaetilenglicol	
50		

55 En algunas modalidades, el conector de molécula pequeña es el glicerol o un homólogo del glicerol de la fórmula HO-(CH₂)_o-CH(OH)-(CH₂)_p-OH, en donde, *o* y *p* independientemente son números enteros de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4 o de 1 a aproximadamente 3. En algunas otras modalidades, el conector de molécula pequeña es un derivado de 1,3-diamino-2-hidroxipropano. Algunos de esos derivados tienen la fórmula

60 HO-(CH₂)_m-C(O)NH-CH₂-CH(OH)-CH₂-NHC(O)-(CH₂)_m-OH, en donde, *m* es un entero de 0 a aproximadamente 10, de 0 a aproximadamente 6, de 2 a aproximadamente 6 o de 2 a aproximadamente 4.

Se describen además conectores no nucleótidos que permiten la unión de más de dos compuestos basados en oligonucleótidos. Por ejemplo, el glicerol conector de molécula pequeña tiene tres grupos hidroxilo a los que dichos oligonucleótidos pueden unirse covalentemente. Algunos compuestos basados en oligonucleótidos descritos en la

presente, por lo tanto, comprenden dos o más oligonucleótidos unidos a un conector nucleótido o no nucleótido. Tales oligonucleótidos se denominan "ramificados".

Los compuestos basados en oligonucleótidos descritos en la presente, pueden comprender al menos dos oligonucleótidos antisentido unidos con dos o más extremos 3' libres. Algunas de las formas en las que pueden vincularse dos o más oligonucleótidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Fórmulas de los oligonucleótidos II-V

Fórmula II	
Fórmula III	
Fórmula IV	
Fórmula V	

- 5 En ciertas modalidades de las Fórmulas II y/o V, L es un conector o un enlace de nucleótidos y el Dominio A y/o el Dominio B son oligonucleótidos antisentido que se diseñan para hibridar selectivamente con la misma secuencia de RNA objetivo o diferentes secuencias de RNA objetivo.
- 10 En ciertas modalidades de las Fórmulas II, III, IV o V, L es un conector y el Dominio A y/o el Dominio B y/o el Dominio C son oligonucleótidos antisentido que se diseñan para hibridar selectivamente con la misma secuencia de RNA objetivo o diferentes secuencias de RNA objetivo. Por ejemplo, en una modalidad, el Dominio A y/o el Dominio B y/o el Dominio C de las fórmulas II y/o III son oligonucleótidos antisentido que están diseñados para hibridar selectivamente con la misma secuencia de RNA objetivo. En esta modalidad, el Dominio A y/o el Dominio B y/o el Dominio C pueden diseñarse para hibridar con la misma región en la secuencia de RNA objetivo o con diferentes regiones de la misma secuencia del RNA objetivo.
- 15 En una modalidad adicional, el Dominio A, el Dominio B y el Dominio C son independientemente oligonucleótidos en base a RNA o DNA. En ciertos aspectos de esta modalidad, los oligonucleótidos comprenden oligonucleótidos de cadena principal mixtos.
- 20 En otra modalidad, uno o más del Dominio A y/o el Dominio B y/o el Dominio C de la Fórmula IV es un oligonucleótido antisentido que se diseña para hibridar selectivamente con una secuencia de RNA objetivo y uno o más del Dominio restante A y/o el Dominio B y/o el Dominio C es un oligonucleótido antisentido que se diseña para hibridar selectivamente con una secuencia de RNA objetivo diferente.
- 25 En otras modalidades, uno o más del Dominio A, Dominio B o Dominio C de la Fórmula IV es un antagonista de una superficie celular o receptor intracelular. En ciertas modalidades, el antagonista es un antagonista del TLR.
- 30 En otra modalidad, uno o más del Dominio A y/o el Dominio B y/o el Dominio C de la Fórmula II, III, IV y/o V es un oligonucleótido en base a RNA hibridado con un oligonucleótido en base a RNA complementario tal que el dominio comprende una molécula de siRNA.
- 35 Los oligonucleótidos componentes de compuestos basados en oligonucleótidos de la invención tienen al menos 14 nucleótidos de longitud, pero preferentemente son de 15 a 40 nucleótidos de longitud, preferentemente de 20 a 30 nucleótidos de longitud. De este modo, los oligonucleótidos componentes de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención pueden ser independientemente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud. Estos oligonucleótidos pueden prepararse por métodos reconocidos en la técnica tales como la química de fosforamidato o H-fosfonato que puede llevarse a cabo manualmente o mediante un sintetizador automático. Los enfoques sintéticos representativos se muestran en las Figuras 1A y 1B. Los oligonucleótidos antisentido sintéticos de la invención pueden modificarse además de varias maneras sin comprometer su capacidad para hibridarse con el mRNA. Tales modificaciones pueden incluir al menos un enlace internucleotídico del oligonucleótido que es un alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, éster de fosfato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, fosfato hidroxilo, acetamidato o éster carboximetilo o una combinación de éstos y otros enlaces internucleotídicos entre el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido en el que el enlace fosfodiéster del nucleótido 5' se ha reemplazado con cualquier cantidad de grupos químicos.
- 40 Los oligonucleótidos antisentido sintéticos de la invención pueden comprender combinaciones de enlaces internucleotídicos. Por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 5,149,797 describe oligonucleótidos quiméricos tradicionales que tienen una región central de fosforotioato interpuesta entre regiones de flanco de metilfosfonato o fosforamidato. Además, la patente de los EE.UU. núm. 5,652,356 describe oligonucleótidos quiméricos "invertidos" que comprenden una o más regiones de oligonucleótidos no iónicos (por ejemplo, enlaces alquilfosfonato y/o fosforamidato y/o internucleósido de fosfotriéster) flanqueados por una o más regiones de oligonucleótido fosforotioato. Diferentes oligonucleótidos antisentido sintéticos con enlaces internucleotídicos modificados pueden prepararse de acuerdo con los métodos estándares. En ciertas modalidades, los enlaces de fosforotioato pueden mezclar enantiómeros Rp y Sp, o pueden hacerse estereo regulares o sustancialmente estereo regulares en cualquiera de las formas Rp o Sp.
- 45 Otras modificaciones de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención incluyen aquellos que están internos o al final de la molécula de oligonucleótido e incluyen adiciones a la molécula de los enlaces de fosfato internucleósido, tales como el colesterol, colesterilo o la diamina compuestos con diferentes cantidades de residuos de carbono entre los grupos amino y las modificaciones terminales de ribosa, desoxirribosa y fosfato que se escinden o se entrecruzan en las cadenas opuestas o en enzimas asociadas u otras proteínas que se unen al genoma. Los ejemplos de tales oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótidos con una base y/o azúcar modificados tales como 2'-O, 4'-C-metilen-b-D-ribofuranosilo, o arabinosa en lugar de ribosa, o un oligonucleótido 3', 5' sustituido que tiene un azúcar que, en sus posiciones 3' y 5', está unido a un grupo químico que no es un grupo hidroxilo (en su posición 3') y que no es un grupo fosfato (en su posición 5').
- 50
- 55
- 60

- Otros ejemplos de modificaciones a los azúcares de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención, incluyen modificaciones en la posición 2' del resto de la ribosa que incluyen, pero no se limitan al, 2'-O-sustituido con un grupo -O-alkilo que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados, o con un grupo -O-arilo u -O-alilo que tiene 2-6 átomos de carbono, en donde, dicho grupo -O-alkilo, -O-arilo u -O-alilo pueden estar no sustituidos o puede estar sustituidos, por ejemplo, con grupos halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxi, carbalcoxilo o amino. Ninguna de estas sustituciones pretende excluir la presencia de otros residuos que tienen un grupo 2'-hidroxilo nativo en el caso de la ribosa o 2' H- en el caso de la desoxirribosa.
- Los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención, pueden comprender uno o más ribonucleótidos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos núm. 5,652,355 describe oligonucleótidos híbridos tradicionales que tienen regiones de ribonucleótidos 2'-O-sustituidos que flanquean una región central del DNA. La Patente de Estados Unidos núm. 5,652,356 describe un oligonucleótido híbrido "invertido" que incluye un oligonucleótido que comprende una región de RNA 2'-O-sustituida (o 2' OH, no sustituida) que se encuentra entre dos regiones de oligodesoxirribonucleótidos, una estructura que es invertida en relación con los oligonucleótidos híbridos "tradicionales".
- Los ejemplos no limitantes de oligonucleótidos útiles particularmente de la invención, tienen ribonucleótidos 2'-O-alkilados en sus terminales 3', 5' o 3' y 5', con al menos cuatro, y en algunas modalidades ejemplares cinco, nucleótidos contiguos siendo así modificados. Los ejemplos no limitantes de los grupos 2'-O-alkilados incluyen 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-butilos y 2'-O-metoxi-etilo.
- Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse convenientemente mediante el uso de un sintetizador automático y el enfoque de fosforamidita como se representa esquemáticamente en la Figura 1B, y se describe adicionalmente en el Ejemplo 1. En algunas modalidades, los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se sintetizan mediante un enfoque de síntesis lineal (ver la Figura 1A).
- Un modo alternativo de síntesis es la "síntesis paralela", en la que la síntesis procede externa de una porción del enlace central (ver la Figura 1). Un conector adjunto de soporte sólido puede usarse para la síntesis paralela, como se describe en la patente de los EE.UU. núm 5,912,332. Alternativamente, puede usarse un soporte sólido universal (como el vidrio porosado controlado adjunto de fosfato).
- La síntesis paralela de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención tiene varias ventajas sobre la síntesis lineal: (1) la síntesis paralela permite la incorporación de unidades monoméricas idénticas; (2) a diferencia de la síntesis lineal, ambas (o todas) las unidades monoméricas se sintetizan al mismo tiempo, por lo tanto, el número de las etapas sintéticas y el tiempo requerido para la síntesis es el mismo que el de una unidad monomérica; y (3) la reducción en las etapas sintéticas mejora la pureza y el rendimiento del producto de oligorribonucleótido modulador inmune final.
- Al final de la síntesis mediante ya sea la síntesis lineal o protocolos de síntesis paralelos, los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención pueden desprotegerse convenientemente con una solución de amoníaco concentrada o como lo recomienda el proveedor de fosforamidita, si se incorpora un nucleósido modificado. Los compuestos basados en oligonucleótidos del producto se purifican preferentemente mediante HPLC de fase inversa, destitución, desalinizado y dializado.
- Una lista no limitante de los compuestos basados en oligonucleótidos descritos en la presente se muestra en la sec. con núm. de ident. 1 a través de la sec. con núm. de ident. 175 en la Tabla 3 a continuación. Como se muestra en la Tabla 3, los compuestos basados en oligonucleótidos tienen enlaces de fosfortioato (PS), pero pueden incluir además enlaces fosfodiéster (o). Aquellos con experiencia en la técnica reconocerán, sin embargo, que pueden incluirse otros enlaces en base a porciones de fosfodiéster o no fosfodiéster.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

Tabla 3.

sec. con núm. de ident. / AS#	mRNA Objetivo	DNA / RNA (especies)	Secuencias Ejemplares de la Invención y Oligonucleótidos de Control	Estructura
1 / AS1	TLR9	DNA (h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3' (Control)	5'(sec. con núm. de ident. 1)-3'
2 / AS2	TLR9	DNA (h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 2)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 2)-3'
3 / AS3	TLR9	DNA (h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 3)-3'-X-3'-(sec. con núm. de ident. 3)-5'
4 / AS4	TLR9	RNA (h)	5'-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 4)-3'
5 / AS5	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 5)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 5)-3'
6 / AS6	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 6)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 6)-3'
7 / AS7	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 7)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 7)-3'
8 / AS8	TLR9	DNA (m/h)	3'-A ₀ CC ₀ GA ₀ CAAGGACTTC ₀ GA ₀ C ₀ A ₀ -X- ₀ A ₀ C ₀ A ₀ CTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 8)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 8)-3'
9 / AS9	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X3- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 9)-5'-X3-5'-(sec. con núm. de ident. 9)-3'
10 / AS10	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X1- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 10)-5'-X1-5'-(sec. con núm. de ident. 10)-3'
11 / AS11	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-Z- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 11)-5'-Z-5'-(sec. con núm. de ident. 11)-3'
12 / AS12	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-M- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 12)-5'-M-5'-(sec. con núm. de ident. 12)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

13 / AS13	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-L- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 13)-5'-L-5'-(sec. con núm. de ident. 13)-3'
14 / AS14	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTUCAGACA-X- ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 14)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 14)-3'
15 / AS15	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X- ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 15)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 15)-3'
16 / AS16	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X- ACAGACTUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 16)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 16)-3'
17 / AS17	TLR9	RNA (m/h)	3'-AGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 17)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 17)-3'
18 / AS18	TLR9	RNA (m/h)	3'-CAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 18)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 18)-3'
19 / AS19	TLR9	RNA (h)	3'-ACGCCGUAGAGUUGGAGUUC-X- CUUGAGGUUGAGAUGCCGCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 19)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 19)-3'
20 / AS20	TLR7	DNA (m)	3'-CCTGACGTGCTGTTGTTAA-X- AATGCTTGCTGTGCAGTCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 20)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 20)-3'
21 / AS21	TLR7	RNA (m)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X- AAUGCUUGUCUGGCAGUCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 21)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 21)-3'
22 / AS22	TLR7	RNA (m)	3'-UCGUGUUCUUCAGUUCU-X- ACUUUGACCUUUGUGUCU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 22)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 22)-3'
23 / AS23	TLR7	RNA (h)	3'-UUGUAGUUGUUGAGUCC-X- CCUGGAGUUUGUUGAUGUU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 23)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 23)-3'
24 / AS24	MyD88	DNA (m)	3'-GTCCGACGATCTCGACGACC-X- CCAGCAGCTCTAGCAGCTG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 24)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 24)-3'
25 / AS25	MyD88	RNA (m)	3'-GUCCGACGAUCUCGACGACC-X- CCAGCAGCUCUAGCAGCCUG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 25)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 25)-3'
26 / AS26	TLR7	DNA (m)	5'-AATGCTTGCTGTGCAGTCC-3' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 26)-3'
27 / AS27	TLR7	DNA (m)	3'-CCTGACGTGCTGTTGTTAA-X- AATGCTTGCTGTGCAGTCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 27)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 27)-3'
28 / AS28	TLR7	RNA (m/h)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-5' (Control)	3'-(sec. con núm. de ident. 28)-5'
29 / AS29	TLR7	RNA (m/h)	5'- <u>CUU</u> CoAoAoUoGoCoUoGoUoGoCoAoGoUoCoCo <u>ACGAAU</u> -3' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 29)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

30 / AS30	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 30)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 30)-3'
31 / AS31	TLR9	DNA (m/h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCC-X-CCGACAAGGACTTCAGACA-5' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 31)-3'-X-3'-(sec. con núm. de ident. 31)-5'
32 / AS32	TLR9	DNA (m/h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 32)-3'
33 / AS33	TLR7	DNA (m/h)	3'-CTGACGTGTCTGTTTCGTAA-X-AATGCTTGCTGTGCAGTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 33)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 33)-3'
34 / AS34	TLR7	DNA (m/h)	5'-AATGCTTGCTGTGCAGTC-X-CTGACGGTGTCTGTTTCGTAA-5' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 34)-3'-X-3'-(sec. con núm. de ident. 34)-5'
35 / AS35	TLR7	DNA (m/h)	5'-AATGCTTGCTGTGCAGTCC-3' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 35)-3'
36 / AS36	MyD88	DNA (h)	3'-CGTTGACCTCTGTGTTCCGC-X-CGCTTGCTCCAGTTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 36)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 36)-3'
37 / AS37	MyD88	DNA (h)	5'-CGCTTGCTCTCCAGTTGC-X-CGTTGACCTCTGTGTTCCGC-5' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 37)-3'-X-3'-(sec. con núm. de ident. 37)-5'
38 / AS38	MyD88	DNA (h)	5'-CGCTTGCTCTCCAGTTGC-3' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 38)-3'
39 / AS39	VEGF	DNA (h)	3'-GAAAGACGACAGAACCAC-X-CACCCAAGACAGCAGAAAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 39)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 39)-3'
40 / AS40	VEGF	DNA (h)	5'-CACCCAAGACAGCAGAAAG-X-GAAAGACGACAGAACCAC-5' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 40)-3'-X-3'-(sec. con núm. de ident. 40)-5'
41 / AS41	VEGF	DNA (h)	5'-CACCCAAGACAGCAGAAAG-3' (Control)	5'-(sec. con núm. de ident. 41)-3'
42 / AS42	TLR9	DNA (m/h)	3'-CAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 42)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 42)-3'
43 / AS43	TLR9	DNA (m/h)	3'-GACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 43)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 43)-3'
44 / AS44	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 44)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 44)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

45 / AS45	TLR9	DNA (m/h)	3'-AACCAGCAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCAA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 45)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 45)-3'
46 / AS46	TLR9	DNA (m/h)	3'-TTAACCAGCAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCAAATT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 46)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 46)-3'
47 / AS47	TLR9	DNA (m/h)	3'-CGTTAACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCAAATTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 47)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 47)-3'
48 / AS48	TLR9	DNA (m/h)	3'-GACGTTAACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCCAAATTGCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 48)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 48)-3'
49 / AS49	TLR9	DNA (h)	3'-GACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 49)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 49)-3'
50 / AS50	TLR9	DNA (h)	3'-TTGACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAGTT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 50)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 50)-3'
51 / AS51	TLR9	DNA (m/h)	3'-CoCoGoAoCoAoGoAoCoToToCoAoGoAoCoAo-X- oAoCoAoGoAoCoToToCoAoGoAoCoAoGoCoC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 51)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 51)-3'
52 / AS52	TLR9	DNA (m/h)	5'-C-3'-3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'-3'-C-5'	3'-(sec. con núm. de ident. 52)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 52)-3'
53 / AS53	TLR9	DNA (m/h)	5'-GCC-3'-3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'-3'-CCG-5'	3'-(sec. con núm. de ident. 53)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 53)-3'
54 / AS54	TLR9	DNA (m/h)	5'-CAGCC-3'-3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'-3'-CCGAC-5'	3'-(sec. con núm. de ident. 54)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 54)-3'
55 / AS55	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 55)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 55)-3'
56 / AS56	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 56)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 56)-3'
57 / AS57	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 57)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 57)-3'
58 / AS58	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-Y-ACAGACTTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 58)5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 58)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

59 / AS59	TLR9	DNA (m/h)	3'-CTTCAGACA-X-ACAGACTTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 59)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 59)-3'
60 / AS60	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGGAACAGCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 60)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 60)-3'
61 / AS61	TLR9	DNA (m/h)	3'-TTGACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGGAACAGCCAGTT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 61)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 61)-3'
62 / AS62	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X5-ACAGACTTCAGGGAACAGCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 62)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 62)-3'
63 / AS63	TLR7	DNA (m/h)	3'-GACGTGCTGTTTCGTAA-X-AATGCTTGTCTGTGCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 63)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 63)-3'
64 / AS64	TLR7	DNA (m/h)	3'-CTGACGTGCTGTTTCGTAA-X-AATGCTTGTCTGTGCAGTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 64)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 64)-3'
65 / AS65	TLR7	DNA (m/h)	3'-ACCTGACGTGCTGTTTCGTAA-X-AATGCTTGTCTGTGCAGTCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 65)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 65)-3'
66 / AS66	MyD88	DNA (m)	3'-ACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 66)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 66)-3'
67 / AS67	MyD88	DNA (m)	3'-CGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCAGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 67)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 67)-3'
68 / AS68	MyD88	DNA (m)	3'-TCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCAGCCT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 68)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 68)-3'
69 / AS69	MyD88	DNA (m)	3'-CGTCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCAGCCTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 69)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 69)-3'
70 / AS70	MyD88	DNA (m)	3'-GCCGTCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCAGCCTGCCG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 70)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 70)-3'
71 / AS71	MyD88	DNA (m)	3'-CAGCCGTCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCAGCCTGCCGAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 71)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 71)-3'
72 / AS72	MyD88	DNA (h)	3'-GACCTCTGTTTCGC-X-CGCTTGTGTTCTCCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 72)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 72)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

73 / AS73	MyD8 8	DNA (h)	3'-TTGACCTCTGTGTTCCG-X-CGCTTGTGTCTCCAGTT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 73)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 73)-3'
74 / AS74	MyD8 8	DNA (h)	3'-CGTTGACCTCTGTGTTCCG-X-CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 74)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 74)-3'
75 / AS75	MyD8 8	DNA (h)	3'-GCCGTTGACCTCTGTGTTCCG-X-CGCTTGTGTCTCCAGTTGCCG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 75)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 75)-3'
76 / AS76	MyD8 8	DNA (h)	3'-AGGCCGTTGACCTCTGTGTTCCG-X-CGCTTGTGTCTCCAGTTGCCGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 76)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 76)-3'
77 / AS77	MyD8 8	DNA (h)	3'-CTAGGCCGTTGACCTCTGTGTTCCG-X-CGCTTGTGTCTCCAGTTGCCGATC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 77)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 77)-3'
78 / AS78	MyD8 8	DNA (m)	3'-JCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCAGCCU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 78)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 78)-3'
79 / AS79	MyD8 8	DNA (h)	3'-CGUUGACCTCTGTGTTCCG-X-CGCTTGTGTCTCCAGUUGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 79)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 79)-3'
80 / AS80	MyD8 8	DNA (h)	3'-CGTTGACCTCTGTGTTCCG-Z-CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 80)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 80)-3'
81 / AS81	MyD8 8	DNA (h)	(3'-CGTTGACCTCTGTGTTCCG)-Z-Z-(CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-3')	3'-(sec. con núm. de ident. 81)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 81)-3'
82 / AS82	TLR3	DNA (m)	3'-CTTGAGGTTCTTGACG-X-GCAGTTCTTGAGGTTTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 82)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 82)-3'
83 / AS83	TLR3	DNA (m)	3'-CTCTTGAGGTTCTTGACG-X-GCAGTTCTTGAGGTTCTTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 83)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 83)-3'
84 / AS84	TLR3	DNA (m)	3'-ACCTCTTGAGGTTCTTGACG-X-GCAGTTCTTGAGGTTCTCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 84)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 84)-3'
85 / AS85	TLR3	DNA (h)	3'-CGTGGAAATTGACCTTC-X-CTTCCATGTTAAGGTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 85)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 85)-3'
86 / AS86	TLR3	DNA (h)	3'-CTCGTGGAAATTGACCTTC-X-CTTCCATGTTAAGGTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 86)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 86)-3'
87 / AS87	TLR3	DNA (h)	3'-ACCTCGTGGAAATTGACCTTC-X-CTTCCATGTTAAGGTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 87)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 87)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

88 / AS88	VEGF	DNA (h)	3'- GAAAGACGACAGAAACCAC-X-CACCCAAGACAGCAGAAAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 88)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 88)-3'
89 / AS89	Mdm2	DNA (h)	3'-CACTCTTGTCACAG-X-GACACCTGTTCTCAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 89)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 89)-3'
90 / AS90	Mdm2	DNA (h)	3'-CTCACTCTTGTCACAG-X-GACACCTGTTCTCACTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 90)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 90)-3'
91 / AS91	Mdm2	DNA (h)	3'-CACTCACTCTTGTCACAG-X-GACACCTGTTCTCACTCAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 91)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 91)-3'
92 / AS92	Mdm2	DNA (h)	3'-GACACTCACTCTTGTCACAG-X-GACACCTGTTCTCACTCACAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 92)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 92)-3'
93 / AS93	Mdm2	DNA (h)	3'-TAGACACTCACTCTTGTCACAG-X-GACACCTGTTCTCACTCACAGAT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 93)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 93)-3'
94 / AS94	Mdm2	DNA (h)	3'-CACTCACTCTTGTCACAG-Y-GACACCTGT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 94)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 94)-3'
95 / AS95	Mdm2	DNA (h)	3'-TGTCACAG-X-GACACCTGT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 95)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 95)-3'
96 / AS96	BCL2	DNA (h)	3'-CCTCTATCACTACTTCATG-X-GTACTTCATCACTATCTCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 96)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 96)-3'
97 / AS97	Survivina	DNA (h)	3'-CCTGTCTCTTCTCGGTTC-X-CTGGCTCTTCTCTGTCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 97)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 97)-3'
98 / AS98	EGFR	DNA (h)	3'-GTTGACACTGTCTAGTAT-X-TATGATCTGTCACAGCTTG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 98)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 98)-3'
99 / AS99	EGFR	DNA (h)	3'-CTTCCCTCCTTGGATCG-X-GCTAGGTTTCCCTCCCTTTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 99)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 99)-3'
100 / AS100	PCSK9	DNA (h)	3'-CTCCGTCTGACTAGGTG-X-GTGGATCAGTCTCTGCCTC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 100)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 100)-3'
101 / AS101	PCSK9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACAT-Y-TACACCTCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 101)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 101)-3'
102 / AS102	PCSK9	DNA (h)	3'-CTCCGTCTGACTAGGTG-Y-GTGGATCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 102)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 102)-3'

103 / AS103	PCSK 9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTC-Y-CTTGACTTT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 103)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 103)-3'
104 / AS104	PCSK 9	DNA (h)	3'-CCTCCACAT-X-TACACCTCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 104)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 104)-3'
105 / AS105	PCSK 9	DNA (h)	3'-GACTAGGTG-X-GTGGATCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 105)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 105)-3'
106 / AS106	PCSK 9	DNA (h)	3'-TTTCAGTTC-X-CTTGACTTT-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 106)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 106)-3'
107 / AS107	PCSK 9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCA-X-ACTTGCAATCCAGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 107)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 107)-3'
108 / AS108	PCSK 9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCA-GT-X-TGACTTTGCAATCCAGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 108)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 108)-3'
109 / AS109	PCSK 9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCA-GTTC-X-CTTGACTTTGCAATCCAGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 109)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 109)-3'
110 / AS110	PCSK 9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCA-GTTCCT-X-TCCCTTGACTTTGCAATCCAGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 110)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 110)-3'
111 / AS111	PCSK 9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCA-GTTCCTCTG-X-GCTCCTTGACTTTGCAATCCAGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 111)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 111)-3'
112 / AS112	PCSK 9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCA-GTTCCTCTGTA-X-ATGCTCCTTGACTTTGCAATCCAGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 112)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 112)-3'
113 / AS113	PCSK 9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACCTCC-X-CCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 113)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 113)-3'
114 / AS114	PCSK 9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCAC-X-CACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 114)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 114)-3'
115 / AS115	PCSK 9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACAT-X-TACACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 115)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 115)-3'
116 / AS116	PCSK 9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACATAG-X-GATACACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 116)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 116)-3'
117 / AS117	PCSK 9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACCTCCACATAGAG-X-GAGATACACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 117)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 117)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

118 / AS118	PCSK 9	DNA (h)	3'-CGTGGACACCTCCACATAGAGGA-X-AGGAGATACACCTCCACACAGGCTGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 118)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 118)-3'
119 / AS119	PCSK 9	DNA (m)	3'-CCAGGAAGTCTCGTCCAGT-X-TGACCTGCTCTGAAGGACC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 119)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 119)-3'
120 / AS120	TLR9	RNA (m/h)	3'-GACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 120)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 120)-3'
121 / AS121	TLR9	RNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 121)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 121)-3'
122 / AS122	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 122)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 122)-3'
123 / AS123	TLR9	RNA (m)	3'-UUAAACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAAUUU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 123)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 123)-3'
124 / AS124	TLR9	RNA (m)	3'-CGUUAACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAAUUGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 124)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 124)-3'
125 / AS125	TLR9	RNA (m)	3'-GACGUUAACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAAUUGCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 125)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 125)-3'
126 / AS126	TLR9	RNA (h)	3'-GACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 126)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 126)-3'
127 / AS127	TLR9	RNA (h)	3'-UUGACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAGUUU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 127)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 127)-3'
128 / AS128	TLR9	RNA (h)	3'-CGUUGACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCAGUUGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 128)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 128)-3'
129 / AS129	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-AC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 129)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 129)-3'
130 / AS130	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-ACAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 130)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 130)-3'
131 / AS131	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-ACAGAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 131)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 131)-3'
132 / AS132	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X3-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 132)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 132)-3'
133 / AS133	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X1-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 133)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 133)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

134 / AS134	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Z-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 134)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 134)-3'
135 / AS135	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-M-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 135)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 135)-3'
136 / AS136	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-L-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 136)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 136)-3'
137 / AS137	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 137)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 137)-3'
138 / AS138	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 138)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 138)-3'
139 / AS139	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 139)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 139)-3'
140 / AS140	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 140)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 140)-3'
141 / AS141	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 141)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 141)-3'
142 / AS142	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 142)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 142)-3'
143 / AS143	TLR9 / TLR7	RNA / DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-d(AATGCTTGTCTGTGCAGTCC)-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 132)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 35)-3'
144 / AS144	MyD88	RNA (m)	3'-ACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 144)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 144)-3'
145 / AS145	MyD88	RNA (m)	3'-CGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 145)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 145)-3'
146 / AS146	MyD88	RNA (m)	3'-UCCGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGCCU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 146)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 146)-3'
147 / AS147	MyD88	RNA (m)	3'-CGUCCGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGCCU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 147)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 147)-3'
148 / AS148	MyD88	RNA (m)	3'-GCCGUCCGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGCCU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 148)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 148)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

149 / AS149	MyD8 8	RNA (m)	3'-CAGCCGUCGACGUAUCUGACGACC-X- CCAGCAGCUCUAGCAGCCUGCCGAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 149)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 149)-3'
150 / AS150	MyD8 8	RNA (h)	3'-GACCUCUCUGUGUUCGC-X-CGCUUGUGUCUCCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 150)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 150)-3'
151 / AS151	MyD8 8	RNA (h)	3'-UUGACCUUCUGUGUUCGC-X-CGCUUGUGUCUCCAGUUU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 151)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 151)-3'
152 / AS152	MyD8 8	RNA (h)	3'-CGUUGACCUUCUGUGUUCGC-X-CGCUUGUGUCUCCAGUUGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 152)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 152)-3'
153 / AS153	MyD8 8	RNA (h)	3'-GCCGUUGACCUUCUGUGUUCGC-X- CGCUUGUGUCUCCAGUGCCG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 153)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 153)-3'
154 / AS154	MyD8 8	RNA (h)	3'-AGCCGUUGACCUUCUGUGUUCGC-X- CGCUUGUGUCUCCAGUGCCGA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 154)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 154)-3'
155 / AS155	MyD8 8	RNA (h)	3'-CUAGGCCGUUGACCUUCUGUGUUCGC-X- CGCUUGUGUCUCCAGUGCCGAUC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 155)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 155)-3'
156 / AS156	TLR7	RNA (m/h)	3'-CGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 156)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 156)-3'
157 / AS157	TLR7	RNA (m/h)	3'-GACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 157)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 157)-3'
158 / AS158	TLR7	RNA (m/h)	3'-CUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 158)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 158)-3'
159 / AS159	TLR7	RNA (m/h)	3'-ACCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X- AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 159)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 159)-3'
160 / AS160	TLR7	RNA (m/h)	3'-GCACCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X- AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCACG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 160)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 160)-3'
161 / AS161	TLR7	RNA (m/h)	3'-UAGCACCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X- AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCAGAU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 161)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 161)-3'
162 / AS162	TLR7 / TLR9	RNA / DNA (m/h)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-Y-d(ACAGACTTCAGGAA-CAGCCA)- 3'	3'-(sec. con núm. de ident. 21)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 1)-3'
163 / AS163	TLR3	RNA (m)	3'-CUUGGAGGUUCUUGACG-X-GCAGUUCUUGGAGGUUC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 163)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 163)-3'
164 / AS164	TLR3	RNA (m)	3'-CUCUUGGAGGUUCUUGACG-X-GCAGUUCUUGGAGGUUCUC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 164)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 164)-3'

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

165 / AS165	TLR3	RNA (m)	3'-ACCUCUUGGAGGUUCUUGACG-X-GCAGUUCUUGGAGGUUCUCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 165)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 165)-3'
166 / AS166	TLR3	RNA (m)	3'-CAAGUCGUUCGAUAACUCG-X-GCUCAAUAGCUUGCUGAAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 166)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 166)-3'
167 / AS167	TLR3	RNA (h)	3'-CGUGGAAUUGUACCUUC-X-CUUCUCCAUUUAAAGGUGC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 167)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 167)-3'
168 / AS168	TLR3	RNA (h)	3'-CUCGUGAAUUGUACCUUC-X-CUUCUCCAUUUAAAGGUGCUC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 168)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 168)-3'
169 / AS169	TLR3	RNA (h)	3'-ACCUCGUGGAAUUGUACCUUC-X-CUUCUCCAUUUAAAGGUGUCCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 169)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 169)-3'
170 / AS170	TLR3	RNA (h)	3'-GUUGUUGUUGUAUCGGUUG-X-GUUGGCUAUGUUGUUGUUG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 170)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 170)-3'
171 / AS171	MDM2	RNA (h)	3'-UCACUCUUGUCCACAGU-X-UGACACUUGUUCUCACU-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 171)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 171)-3'
172 / AS172	MDM2	RNA (h)	3'-ACUCACUCUUGUCCACAGU-X-UGACACUUGUUCUCACUCA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 172)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 172)-3'
173 / AS173	MDM2	RNA (h)	3'-ACACUCACUCUUGUCCACAGU-X-UGACACUUGUUCUCACACA-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 173)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 173)-3'
174 / AS174	MDM2	RNA (m)	3'-GGACUUCUCCACUACUAG-X-GAUCACUCCUCCUUCAGG-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 174)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 174)-3'
175 / AS175	VEGF	RNA (h)	3'-CACCCAAAGACAGCAGAAAG-X-GAAAGACGACAGAACCCAC-3'	3'-(sec. con núm. de ident. 175)-5'-X-5'-(sec. con núm. de ident. 175)-3'

X = conector glicerol; X1 = conector 1,2,4-Butanotriol; X3 = conector 2-Hidroximetil-1,3-propanodiol; X5 = conector Bis-1,5-O-(3'imidilo)-1,3,5-Pentanotriol; Y = conector 1,3-propanodiol; Z = conector 1,3,5-Pentanotriol; M = conector *cis*, *cis*-1,3,5-Ciclohexanotriol; L = conector *cis*, *trans*-1,3,5-Ciclohexanotriol; Δ , \underline{U} , \underline{C} , \underline{G} = 2'-OMe; o = enlace internucleotídico de fosfodiéster; h = humano; m = ratón; Excepto donde se indique, todas las moléculas en la Tabla 3 contienen enlaces internucleotídicos de fosforotioato.

5 En este aspecto de la invención, la composición carece de actividad estimuladora inmune de ciertas composiciones de oligonucleótidos. Se conoce que ciertas composiciones en base a oligonucleótidos pueden poseer motivos inmuno estimulantes. Esta actividad estimuladora inmune requiere que los oligonucleótidos no estén unidos o unidos en sus extremos 3'. De este modo, se contempla que como resultado de las composiciones en base a oligonucleótidos de acuerdo con la invención que utilizan un enlace en los extremos 5', como se expone en las Fórmulas I, II, III o IV, se suprime cualquier actividad estimuladora inmune inherente, en comparación con la actividad estimuladora inmune que estaría presente en composiciones en base a oligonucleótidos no unidas en sus extremos 3' o en una forma 2'-5'.

10 Los inventores han descubierto sorprendentemente que la estructura del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención, proporciona un compuesto óptimo para la unión por enzimas y otras proteínas que están implicadas en la inhibición de la expresión de genes mediada por RNasaH y/o RNAi. De este modo, en una modalidad adicional de este aspecto de la invención, los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden unirse selectivamente mediante RNasa H, Dicer, Argonaut, RISC u otras proteínas que están implicadas en la inhibición de la expresión de genes mediada por RNAi. Esta unión selectiva proporciona compuestos basados en oligonucleótidos óptimos para utilizar la inhibición de la expresión de genes mediada por RNasa H y/o RNAi in vitro e in vivo.

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

20 Se describe además, en un tercer aspecto, un método para inhibir la expresión de genes, el método que comprende poner en contacto una célula con un compuesto basado en oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

25 Se describe además, en un cuarto aspecto, un método para inhibir la expresión de genes en un mamífero, el método comprende administrar al mamífero un compuesto basado en oligonucleótidos sintético de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En una modalidad adicional de este aspecto, se contempla que los compuestos basados en oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, pueden inhibir la expresión y la actividad de ciertos genes relacionados con la proliferación celular, que incluyen, pero no se limitan a, oncogenes.

30 Se describe además, en un quinto aspecto, un método de inhibición de la respuesta mediada por el TLR, mediada por Bcl-2, mediada por EGFR, mediada por mdm2, mediada por MyD88, mediada por PCSK9, mediada por survivina, o mediada por VEGF en un mamífero, aunque la administración de un compuesto basado en oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde, los oligonucleótidos son complementarios a una o más secuencias de mRNA que codifican una molécula implicada en la señalización del TLR o Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o la actividad de VEGF.

35 Se describe además, en un sexto aspecto, un método de inhibición de la respuesta mediada por el TLR, mediada por Bcl-2, mediada por EGFR, mediada por mdm2, mediada por MyD88, mediada por PCSK9, mediada por survivina, o mediada por VEGF en un mamífero a través de la administración de un compuesto basado en oligonucleótido sintético de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde, los oligonucleótidos son complementarios a una o más secuencias de mRNA de TLR, Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o VEGF en combinación con un antagonista del TLR, Bcl-2, EGFR, mdm2, MyD88, PCSK9, survivina o la actividad de la proteína VEGF.

40 Se describen además, en un séptimo aspecto, los métodos para inhibir la expresión de genes en un mamífero, tales métodos que comprenden administrar al mamífero un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención. En algunas modalidades, el mamífero es un humano. En modalidades preferidas, el compuesto basado en oligonucleótido de acuerdo con la invención se administra a un mamífero que necesita inhibir su respuesta inmune.

45 Se describen además, en un octavo aspecto, los métodos para tratar terapéuticamente a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, tales métodos comprenden administrar al paciente un compuesto a base de oligonucleótidos de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz terapéuticamente. En diferentes modalidades, la enfermedad o el trastorno que se trata es el cáncer, un trastorno autoinmune, enfermedad infecciosa, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

50 Se describen además, en un noveno aspecto, los métodos para prevenir una enfermedad o trastorno, tales métodos comprenden administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o el trastorno, un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz farmacéuticamente. Se considera que un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno, si el sujeto ha estado o puede estar o estará expuesto a un agente etiológico de la enfermedad o el trastorno o está predispuesto genéticamente a contraer la enfermedad o el trastorno. En diferentes modalidades, la enfermedad o el trastorno que se previene es el cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma, o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

55 Se describen además, en un noveno aspecto, los métodos para prevenir una enfermedad o trastorno, tales métodos comprenden administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o el trastorno, un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz farmacéuticamente. Se considera que un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno, si el sujeto ha estado o puede estar o estará expuesto a un agente etiológico de la enfermedad o el trastorno o está predispuesto genéticamente a contraer la enfermedad o el trastorno. En diferentes modalidades, la enfermedad o el trastorno que se previene es el cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma, o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

60 Se describen además, en un noveno aspecto, los métodos para prevenir una enfermedad o trastorno, tales métodos comprenden administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o el trastorno, un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz farmacéuticamente. Se considera que un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno, si el sujeto ha estado o puede estar o estará expuesto a un agente etiológico de la enfermedad o el trastorno o está predispuesto genéticamente a contraer la enfermedad o el trastorno. En diferentes modalidades, la enfermedad o el trastorno que se previene es el cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma, o una enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

65

Se describe además, en un décimo aspecto, un método de prevención o tratamiento de un trastorno, dicho método comprende aislar células capaces de producir citocinas o quimiocinas que incluyen, pero no se limitan a, las células inmunes, células T reguladoras, células B, PBMCs, pDCs y células linfoides; cultivar dichas células bajo condiciones de cultivo celular estándares, tratar dichas células ex vivo con un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, de manera que las células aisladas produzcan o secreten niveles disminuidos de citocinas o quimiocinas, y administrar o re-administrar las células tratadas a un paciente que necesita terapia para inhibir las citocinas y/o la quimiocina para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad. Este aspecto estaría de acuerdo con las técnicas de inmunoterapia celular adoptiva estándar para producir células inmunes activadas.

En algunas modalidades de este aspecto, las células capaces de producir citocinas o quimiocinas pueden aislarse de sujetos con o sin una enfermedad o trastorno. Tal aislamiento puede incluir la identificación y la selección y podría realizarse mediante el uso de los procedimientos del aislamiento de células estándar, que incluyen los establecidos en los ejemplos específicos a continuación. Tales células aisladas se cultivarían de acuerdo con los procedimientos del aislamiento de células estándar y el uso de condiciones de cultivo de células estándares, que pueden incluir los procedimientos y las condiciones de cultivo expuestas en los ejemplos específicos a continuación. En un aspecto adicional de esta modalidad, las células aisladas se cultivarían en presencia de al menos un compuesto basado en oligonucleótido de acuerdo con la invención, en una cantidad y durante un período de tiempo suficiente para suprimir o inhibir la producción y/o la secreción de citocinas y/o quimiocinas en comparación con las células aisladas cultivadas en ausencia de dicho o más compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Dicho tiempo puede ser de minutos, a horas, a días. Dichas células aisladas y tratadas pueden encontrar uso después de la nueva administración al donante o de la administración a un segundo paciente, en donde dicho donante o segundo paciente necesitan suprimir o inhibir la producción y/o la secreción de citocinas y/o quimiocinas. Por ejemplo, la re-administración a un donante o la administración a un segundo paciente que tiene cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Dicha nueva administración o administración puede llevarse a cabo mediante el uso de diferentes modos, que incluyen catéter o administración por inyección o cualquier otra vía efectiva. Este aspecto puede usarse además en pacientes que pueden tener una capacidad limitada o incompleta para desarrollar una respuesta inmune o están inmunocomprometidos (por ejemplo, un paciente infectado con VIH y pacientes con trasplante de médula ósea).

Se describe además, en un undécimo aspecto, una composición que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención y una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos (tanto quimioterapia tradicional como terapias dirigidas de módem), inhibidores de quinasa, alérgenos, antibióticos, agonistas, antagonistas, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de RNAi, moléculas de siRNA, moléculas de miRNA, aptámeros, proteínas, vectores de terapia de genes, vacunas de DNA, adyuvantes, moléculas coestimuladoras o las combinaciones de éstos.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente, el compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención, puede actuar de diferentes maneras produciendo efectos de modulación de la expresión de genes directos solo y/o en combinación con cualquier otro agente útil para tratar o prevenir la enfermedad o condición que no disminuye el efecto de la modulación de la expresión de genes del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención. En cualquiera de los métodos descritos en la presente, el (los) agente(s) útil(es) para tratar o prevenir la enfermedad o condición incluye(n), pero no se limita(n) a, vacunas, antígenos, anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, agentes citotóxicos, inhibidores de quinasas, alérgenos, antibióticos, moléculas de siRNA, oligonucleótidos antisentido, antagonista del TLR (por ejemplo, antagonistas del TLR3 y/o TLR7 y/o antagonistas del TLR8 y/o antagonistas del TLR9), agentes quimioterapéuticos (tanto quimioterapia tradicional como terapias dirigidas de módem), agentes terapéuticos dirigidos, células activadas, péptidos, proteínas, vectores de terapia de genes, vacunas peptídicas, vacunas proteicas, vacunas de DNA, adyuvantes y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, ligandos de proteínas, factores de activación trans, péptidos o péptidos que comprenden aminoácidos modificados) o las combinaciones de éstos. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, se contempla que el compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede administrarse en combinación con uno o más compuestos quimioterapéuticos, un agente terapéutico dirigido y/o un anticuerpo monoclonal. Alternativamente, el agente puede incluir vectores de DNA que codifican para antígeno o alérgeno. Alternativamente, el compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede administrarse en combinación con otros compuestos (por ejemplo, lípidos o liposomas) para mejorar la especificidad o la magnitud de la modulación de la expresión de genes del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente, la administración de compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención, solos o en combinación con cualquier otro agente, puede ser por cualquier vía adecuada, que incluye, sin limitarse a, la administración parenteral, mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, por pistola de genes, parche dérmico o en forma de gota ocular o enjuague bucal. La administración de las composiciones terapéuticas de los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo mediante el uso de procedimientos conocidos que usan una cantidad eficaz y durante períodos de tiempo eficaces para reducir los síntomas o marcadores sustitutos de la enfermedad. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención

para tratar una enfermedad y/o trastorno, podría ser la cantidad necesaria para aliviar o reducir los síntomas, o retrasar o mejorar un tumor, cáncer, o infección bacteriana, viral o fúngica. En el contexto de la administración de una composición que modula la expresión de genes, una cantidad eficaz de un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención es una cantidad suficiente para lograr la modulación deseada en comparación con la expresión de genes en ausencia del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención. La cantidad efectiva para cualquier aplicación particular puede variar en dependencia de factores tales como la enfermedad o condición que se está tratando, el oligonucleótido particular que se está administrando, el tamaño del sujeto o la severidad de la enfermedad o la condición. El experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad efectiva de un oligonucleótido particular sin necesidad de una experimentación excesiva.

Cuando se administra de manera sistémica, la composición terapéutica se administra preferentemente a una dosis suficiente para alcanzar un nivel en sangre de un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención de aproximadamente 0.0001 micromolar a aproximadamente 10 micromolar. Para la administración localizada, concentraciones más bajas que estas pueden ser eficaces, y pueden tolerar concentraciones mucho más altas. Preferentemente, una dosis total del compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la invención oscila de aproximadamente 0.001 mg por paciente por día a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. En ciertas modalidades, la dosis total puede ser de 0.08, 0.16, 0.32, 0.48, 0.32, 0.64, 1, 10 o 30 mg/kg de peso corporal administrados diariamente, dos veces a la semana o semanalmente. Puede desearse administrar simultáneamente o secuencialmente una cantidad efectiva terapéuticamente de una o más de las composiciones terapéuticas de la invención a un individuo como un único episodio de tratamiento.

Los métodos de acuerdo con este aspecto son útiles para los estudios modelos de la expresión de genes. Los métodos son útiles además para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades humanas o de animales. Por ejemplo, los métodos son útiles para la inhibición pediátrica y veterinaria de las aplicaciones de la expresión de genes.

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

Ejemplo 1:

Preparación de compuestos basados en oligonucleótidos

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se sintetizaron químicamente mediante el uso de la química de fosoramidita en un sintetizador automatizado de DNA/RNA. Los monómeros de RNA 2'-O-TBDMS (excepto U) protegidos con TAC, A, G, C y U, se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los monómeros 7-deaza-G de inosina y loxoribina se adquirieron de ChemGenes Corporation. 0.25 M de 5-etiltio-1H-tetrazol, PAC-anhídrido Cap A y Cap B se compraron de Glen Research. 3 % de ácido tricloroacético (TCA) en diclorometano (DCM) y 5 % 3H-1,2-Benzoditiole-3-ono-1,1-dióxido (reactivo de Beaucage) se hicieron en casa.

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se sintetizaron a una escala de 1-2 μ M mediante el uso de un protocolo de síntesis de RNA estándar.

Escisión y desprotección de bases

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se escindieron del soporte sólido y la solución se calentó adicionalmente a 65 °C para eliminar los grupos protectores de las exociclicaminas. La solución resultante se secó por completo en un SpeedVac.

Purificación HPLC IE

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se purificaron mediante HPLC de intercambio iónico.

Columna: Columna DionexDNAPac 100 (22X250)

Calentador de columna: Calentador de columna ChromTech TL-105 HPLC, la temperatura se establece en 80 °C.

Tampón A: 20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 20 % acetonitrilo

Tampón B: 3.0 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 20 % acetonitrilo

Velocidad de flujo: 10 ml/min

Gradiente:

0-2 min: 0 % B

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

11-41 min: 35 % B hasta 90 % B

41-45 min: 100% B

La solución cruda del compuesto basado en oligonucleótidos de la invención se inyectó en el HPLC. Se realiza sobre el gradiente anterior y se recogieron las fracciones. Todas las fracciones que contenían más del 90 % del producto

deseado se mezclaron, y la solución después se concentró hasta que casi se secó mediante RotoVac. Agua libre de RNAasa se añadió para obtener un volumen final de 10 mL.

5 C-18 Desalinización de Fase Inversa

El cartucho CC-18 Sep-Pak adquirido de Waters se acondicionó primero con 10 mL de acetonitrilo seguido de 10 mL de 0.5 M acetato sódico. Se cargaron 10 mL de la solución de compuestos basados en oligonucleótidos de la invención. Después se usaron 15 mL de agua para lavar la sal. Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se eluyeron en 1 mL de acetonitrilo al 50 % en agua.

10 La solución se coloca en SpeedVac durante 30 minutos. La solución restante se filtró a través de un filtro de 0.2 micras y luego se liofilizó hasta secarse. El sólido después se volvió a disolver en agua para obtener la concentración deseada.

15 La solución final se almacenó a menos de 0 °C.

Electroforesis de Capilar

Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se analizaron mediante electroforesis de capilar de acuerdo con las siguientes condiciones.

20 Instrumento Beckman 5010

Capilar: capilar 62 cm ssDNA

Preparación de muestras: Se disolvió 0.2 OD de la composición en base a oligonucleótidos de acuerdo con la invención, en 200 µL de agua libre de RNAasa.

Inyección: inyección cinética electro a 5KV durante 5 segundos.

25 Estado de Operación: 14KV durante 50 minutos a 30 °C.

Análisis de HPLC de intercambio Iónico

30 Los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención se analizaron por HPLC de intercambio iónico de acuerdo con las siguientes condiciones

Columna: columna de protección DionexDNAPac (22X250)

Calentador de columna: calentador de columna ChromTech TL-105 HPLC, la temperatura se establece en 80 °C.

35 Tampón A: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 % acetonitrilo

Tampón B: 2.0 M LiCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 % acetonitrilo

Velocidad de flujo: 2 mL/min

Gradiente:

0-2 min: 0 % B

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

40 10-15 min: 100% B

Análisis PAGE

45 Se cargó 0.3 OD de los compuestos basados en oligonucleótidos de la invención en gel de poliacrilamida al 20 % y se operó a una potencia constante de 4 watts durante aproximadamente 5 horas. El gel se observó con luz ultravioleta de onda corta.

Ejemplo 2:

50 Aislamiento de PBMC humanas

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de la sangre del voluntario sano recién extraída (CBR Laboratories, Boston, MA) se aislaron mediante el método de centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll (Histopaque-1077, Sigma).

55 Aislamiento de pDC humana

Las células dendríticas plasmocitoides humanas (pDCs) se aislaron de las PBMCs de sangre de voluntarios humanos sanos por selección positiva mediante el uso de los estuches de aislamiento de células BDCA4 (MiltenyiBiotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

60 Tratamiento de PBMCs y pDCs

Las PBMC humanas se sembraron en placas de 48 pocillos usando 5×10^6 células/mL. Las pDCs humanas se sembraron en placas de 96 pocillos usando 1×10^6 células/mL. Los compuestos a base de oligonucleótidos ejemplares de la

invención, se disolvieron en DPBS (pH 7.4; Mediatech), se añadieron a los cultivos celulares a dosis de 0, 0.01, 1.0 o 10.0 µg/mL. Las células se incubaron después a 37 °C durante 24 horas y posteriormente se estimularon con 10 µg/mL con el agonista del TLR9 durante 24 h. Después del tratamiento y la estimulación, los sobrenadantes se recogieron para los ensayos de multiplex luminex o ELISA. En determinados experimentos, los niveles de IFN-α, IL-6 y/o IL-12 se midieron mediante ELISA sándwich. Los reactivos requeridos, que incluyen los anticuerpos de las citocinas y los estándares, se adquirieron de PharMingen.

Ensayo de células B humanas para la actividad antisentido del TLR9

Se aislaron células B humanas de PBMCs mediante selección positiva mediante el uso del estuche de Aislamiento de Células CD 19 (MiltenyiBiotec, Auburn, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El medio de cultivo que se usó para el ensayo consistió en medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 1.5 mM, 1 mM de piruvato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 100 IU/mL mezcla de penicilina estreptomocina y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor.

Un total de 0.5×10^6 células B por mL (es decir, (i.e. 1×10^5 /200 µl/pocillos) se incubaron en placas de fondo plano de 96 pocillos con 50 µg/mL de los compuestos a base de oligonucleótidos ejemplares de la invención durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se estimularon con 10 µg/mL del agonista del TLR9 durante 24 h. A continuación del tratamiento y la estimulación, se prepararon los extractos celulares y se analizaron por la cantidad de mRNA de TLR9.

Ensayo de Cultivo de Células HEK293 para la actividad antisentido del TLR9 o TLR7

Las células HEK293 que expresan de forma estable el TLR9 o el TLR7 de ratón (Invivogen, San Diego, CA), se sembraron en placas de 48 pocillos en 250 µL/pocillo de DMEM suplementado con 10 % de FBS inactivado por calor en una incubadora de CO₂ al 5 %. Con una confluencia del 80%, los cultivos se transfectaron transitoriamente con 400 ng/mL del plásmido indicador (SEAP) de la fosfatasa alcalina embrionaria humana (pNifty2-Seap) (Invivogen) en presencia de 4 µL/mL de lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) en medio de cultivo. El DNA del plásmido y la lipofectamina se diluyeron por separado en medio libre de suero y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Después de la incubación, el DNA diluido y la lipofectamina se mezclaron y las mezclas se incubaron adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 minutos. Alícuotas de 25 µL de la mezcla de DNA/lipofectamina que contiene 100 ng del DNA plasmídico y 1 µL de lipofectamina se añadieron a cada pocillo de la placa de cultivo celular, y las células se transfectaron durante 6 h. Después de la transfección, el medio se reemplazó con medio de cultivo nuevo (sin antibióticos) y se añadieron 0, 0.01, 1 o 10 µg/mL de compuestos basados en oligonucleótidos específicos del TLR9 o TLR7 de la invención a los pocillos, y la incubación continuó durante 24 h. A continuación el tratamiento antisentido, las células se estimularon además con 10 µg/mL del agonista del TLR9 o TLR7 durante 24 h.

Al final del tratamiento y la estimulación, se tomaron 20 µL de sobrenadante de cultivo de cada pocillo y se analizaron para el ensayo SEAP mediante el método Quanti Blue de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invivogen). Los datos se muestran como incremento de veces en la actividad de NF-κB sobre el control de PBS.

Ensayos de cultivo de células de HEK293 para TLR7, TLR8 u otra actividad antisentido dirigida de RNA específico

Para determinar la actividad de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención para inhibir el TLR7 o el TLR8 o cualquier otro objetivo de RNA específico, el procedimiento a continuación se seguirá: Sembrar las células HEK293 que expresan de forma estable el TLR7 o el TLR8 de ratón u otro objetivo de RNA específico (Invivogen, San Diego, CA), en placas de 48 pocillos en 250 µL/pocillo de DMEM suplementado con 10 % de FBS inactivado por calor en una incubadora de CO₂ al 5%. Transfectar transitoriamente los cultivos de una confluencia del 80%, con 400 ng/mL del plásmido indicador (SEAP) de la fosfatasa alcalina embrionaria humana (pNifty2-Seap) (Invivogen) en presencia de 4 µL/mL de lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) en medio de cultivo. Diluir por separado en medio sin suero el DNA del plásmido y la lipofectamina e incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Después de la incubación, mezclar el DNA diluido y la lipofectamina e incubar las mezclas adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 minutos. Agregar alícuotas de 25 µL de la mezcla de DNA/lipofectamina que contiene 100 ng de DNA del plásmido y 1 µL de lipofectamina a cada pocillo de la placa de cultivo celular, y transfectar las células durante 6 h. Después de la transfección, reemplazar el medio con medio de cultivo fresco (sin antibióticos) y agregar 0, 0.01, 1 o 10 µg/mL de oligonucleótidos antisentido específicos de acuerdo con la invención, a los pocillos, y continuar la incubación durante 24 h. A continuación del tratamiento antisentido, estimular las células con el agonista del objetivo hasta 24 h.

Al final del tratamiento y la estimulación, tomar 20 µL del sobrenadante de cultivo de cada pocillo y analizar para el ensayo SEAP mediante el método Quanti Blue de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invivogen). Mostrar los datos como el incremento de veces en la actividad de NF-κB sobre el control de PBS.

Ensayo de células murinas J774 para la actividad antisentido del TLR9

Las células de macrófagos murinos J774 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD) se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (v/v) y antibióticos (100 UI/mL de penicilina G/100 µg/mL de estreptomina). Las células J774 a una densidad de 5×10^6 células/pocillo se sembraron en placas de seis pocillos. Para los experimentos dependientes de la dosis, las células J774 se trataron después con 0, 1, 10, 50 o 100 µg/mL de compuestos basados en oligonucleótidos específicos de TLR9 de la invención y se continuó la incubación durante 24 h. Para los experimentos que determinan los efectos sobre el mRNA, las células J774 se trataron después con 0, 1 o 3 µg/mL de compuestos basados en oligonucleótidos específicos de TLR9 de la invención u oligonucleótidos de control y se continuó la incubación durante 48 h. Para los experimentos que determinan los efectos sobre la proteína, las células J774 se trataron después con 0, o 50 µg/mL de compuestos basados en oligonucleótidos específicos de TLR9 de la invención u oligonucleótidos de control y se continuó la incubación durante 48 h. A continuación el tratamiento antisentido, los extractos celulares se prepararon y se analizaron por la cantidad de mRNA del TLR9 o de la proteína TLR9.

Ensayo de células HeLa para la actividad antisentido de VEGF

Las células HeLa a 5×10^6 (ATCC, Manassas, VA) se sembraron en una placa de cultivo de 12 pocillos en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Mediatech, Manassas, VA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Mediatech, Manassas, VA). Para la transfección celular, se mezclaron 5 µL de Lipofectamina® 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 5 µg de oligonucleótidos antisentido en 100 µL de DMEM sin suero y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron una vez con DMEM sin suero y se añadieron 100 µL de lipofectamina/complejos de oligonucleótidos a 900 µL de DMEM sin suero y a continuación 2 horas de incubación a 37 °C con 5 % de CO₂. Un grupo de lipofectamina solo sirvió como control. El medio se cambió después a DMEM con 10 % de FBS y se incubó durante 24 horas. A continuación de la incubación de 24 horas, el RNA total se aisló mediante el uso del estuche mini kit QIAGEN RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA) de acuerdo con la sugerencia del fabricante. Se usó 1 µg de RNA para la transcripción reversa a cDNA mediante el uso del estuche High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Para la PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR), los cebadores y las sondas para VEGF (catálogo núm. Hs00900057_ml) y GAPDH (Hs99999905_ml) se adquirieron de Applied Biosystems. Se usaron 50 ng de cDNA en la qPCR con Taqman® Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems) y las reacciones operaron en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems StepOnePlus™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se representan en la Figura 8D como la cantidad relativa de mRNA a células tratadas con lipofectamina mediante el uso del método $\Delta\Delta CT$, donde $\Delta CT = CT_{VEGF} - CT_{GAPDH}$ y $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{oligonucleotido} - \Delta CT_{lipofectamina}$. Cada barra representa 2-3 experimentos separados.

Ensayo de células de Esplenocitos de Ratón C57BL/6 para la actividad antisentido del TLR9

Se cultivaron células de bazo de ratones C57BL/6 de 4 a 8 semanas de edad en medio completo de RPMI. Las células de bazo de ratón se sembraron en placas de 24 pocillos usando 5×10^6 células/mL, se trataron con compuestos basados en oligonucleótidos específicos de TLR9 de la invención disueltos en tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. A continuación del tratamiento antisentido, las células se estimularon después con 10 µg/mL del agonista del TLR9 durante 24 horas. Después del tratamiento y la estimulación, se recogieron los sobrenadantes y se midió la secreción de la IL-12 e IL-6 en sobrenadantes de cultivo celular mediante ELISA sándwich.

Ejemplo 3:

Actividad *in vivo* de composiciones en base a oligonucleótidos

Para evaluar la actividad *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, se inyectaron subcutáneamente en el flanco izquierdo, ratones Hembra C57BL/6 de 5-6 semanas de edad (N = 3/grupo) con composiciones en base a oligonucleótidos ejemplares de acuerdo con la invención a 0.25, 2, o 5 mg/kg, o PBS. Veinticuatro horas después de la administración de las composiciones en base a oligonucleótidos, se inyectaron ratones subcutáneamente en el flanco derecho, con 0.25 mg/kg de un agonista del TLR. Dos horas después de la administración del agonista del TLR, se recogió sangre y se determinó la concentración de la IL-12 en suero mediante ELISA. Los datos se muestran como concentraciones de la IL-12 absolutas o como un porcentaje de la producción de la IL-12.

Duración de la actividad *in vivo* de las composiciones en base a oligonucleótidos

Para evaluar la duración de la actividad *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, se inyectaron los ratones Hembra C57BL/6 de 5-6 semanas de edad (N = 3/grupo) subcutáneamente en el flanco izquierdo con composiciones a base de oligonucleótidos ejemplares de acuerdo con la invención, a 5 mg/kg, o PBS. Veinticuatro horas después de la administración de las composiciones en base a oligonucleótidos, se inyectaron ratones por vía subcutánea en el flanco derecho con 0.25 mg/kg de un agonista del TLR en los días 1, 3, 5, 7, 10 o 14. Dos horas después de cada administración del agonista del TLR, se recogió sangre y se determinó la concentración de la IL-12 en

suero mediante ELISA. Los datos se muestran como concentraciones de la IL-12 absolutas o como un porcentaje de la producción de la IL-12.

Ejemplo 4:

5

Unión selectiva y escisión de los compuestos basados en oligonucleótidos mediante proteínas y enzimas asociadas antisentido.

10

Para evaluar la especificidad de las proteínas y las enzimas asociadas antisentido para unirse y escindir los compuestos basados en oligonucleótidos de acuerdo con la invención o los oligonucleótidos de control, se trataron como sigue: El mRNA objetivo marcado en el extremo 5' [γ - 32 P] (por ejemplo, sec.con núm. ident. 21; 10 nM de TLR7 humano/ratón) y el RNA complementario o DNA (10 nM; TLR7 humano/ratón) en 30 mL de Tampón (tampón 10 X, Invitrogen) se calentaron a 85 °C durante 5 minutos y se enfriaron después a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la hibridación de las dos cadenas. La enzima dicer humana (0.025 U, Invitrogen) se añadió a la solución de reacción y se incubaron después a 37 °C durante 1 hora. Se agregaron 1 mL de solución de parada (Invitrogen) y 10 mL del colorante de carga de gel a la solución de muestra y se mezclaron bien. La muestra se congeló inmediatamente a -80 °C. Los productos de digestión de RNA se analizaron en una PAGE desnaturalizante al 16 % y el gel se expuso a una película de rayos X y se desarrolló el autorradiograma. Los resultados se muestran en la Figura 13.

15

20

Reivindicaciones

- 5 1. Un compuesto basado en oligonucleótidos que comprende dos oligonucleótidos antisentido monocatenarios unidos en sus extremos 5', en donde, el compuesto basado en oligonucleótidos tiene dos extremos 3' accesibles.
2. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde los oligonucleótidos tienen independientemente 15 a 40 nucleótidos de longitud.
- 10 3. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde, los oligonucleótidos están unidos entre sí a través de un enlace de nucleótidos o a través de un conector no nucleotídico.
- 15 4. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde, los oligonucleótidos comprenden uno o más ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, ácidos nucleicos cerrados, nucleótidos de azúcar arabino o una combinación de estos.
- 20 5. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde, al menos uno de los oligonucleótidos se modifica.
- 25 6. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 5, en donde, el oligonucleótido modificado tiene al menos un enlace internucleotídico seleccionado del grupo que consiste en conector alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato y no nucleotídico.
7. El compuesto basado en oligonucleótidos de la reivindicación 5, en donde, el oligonucleótido modificado comprende al menos un nucleótido sustituido con 2'-O seleccionado del grupo que consiste en 2'-O-metilo, 2'-O-metoxi, 2'-O-etoxi, 2'-O-metoxietilo, 2'-O-alkilo, 2'-O-arilo y 2'-O-alilo.
- 30 8. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, cada uno de los oligonucleótidos son complementarios a diferentes secuencias de RNA monocatenario.
- 35 9. Una composición que comprende un compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un portador aceptable fisiológicamente.
- 40 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, agonista del TLR, antagonista del TLR, moléculas de siRNA, moléculas de miRNA, oligonucleótidos antisentido, aptámeros, proteínas, péptidos, vectores de terapia de genes, vacunas de DNA, adyuvantes, moléculas coestimuladoras o las combinaciones de estos.
- 45 11. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para usarse en la inhibición de la expresión de genes.
- 50 12. El compuesto basado en oligonucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para usarse en un método para tratar terapéuticamente un mamífero que tiene una enfermedad o trastorno mediado por una o más proteínas, en donde, al menos uno de los oligonucleótidos es complementario al RNA monocatenario que codifica la o más proteínas.
- 55 13. El compuesto basado en oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para usarse en un método para prevenir una enfermedad o el trastorno mediado por una o más proteínas en un mamífero en riesgo de desarrollar la enfermedad o el trastorno, en donde, al menos uno de los oligonucleótidos es complementario al RNA monocatenario que codifica la o las proteínas.
- 60 14. El compuesto basado en oligonucleótidos para usarse de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde la enfermedad o el trastorno se selecciona del cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos de la piel, alergia, asma, infección bacteriana, viral o fúngica o una enfermedad causada por un patógeno.
15. El compuesto basado en oligonucleótidos para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que se administrará junto con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, agonista del TLR, antagonista del TLR, moléculas de siRNA, moléculas de miRNA, oligonucleótidos antisentido, aptámeros, proteínas, péptidos, vectores de terapia de genes, vacunas de DNA, adyuvantes, moléculas coestimuladoras o las combinaciones de estos.

Figura 1A

Síntesis Lineal de Oligonucleótidos

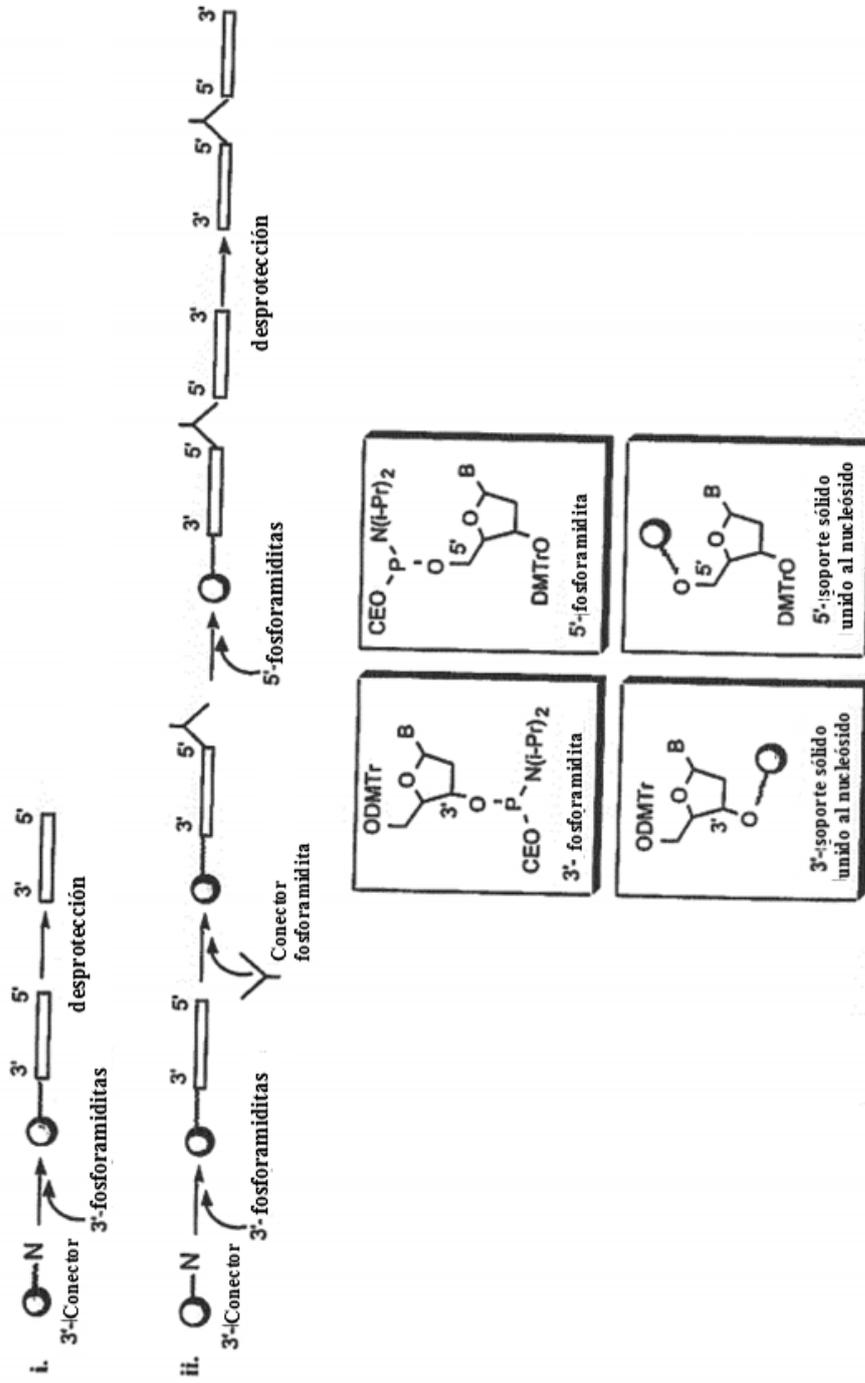


Figura 1B
Síntesis Paralela de Oligonucleótidos

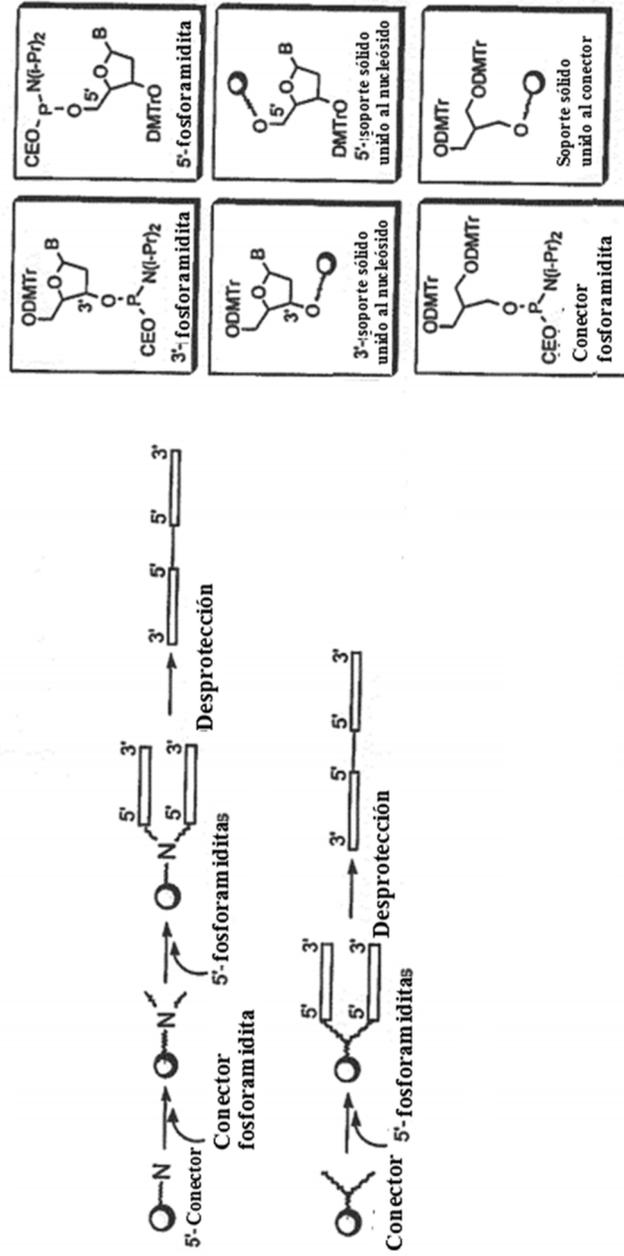


Figura 2A.

Inhibición de la actividad del TLR9

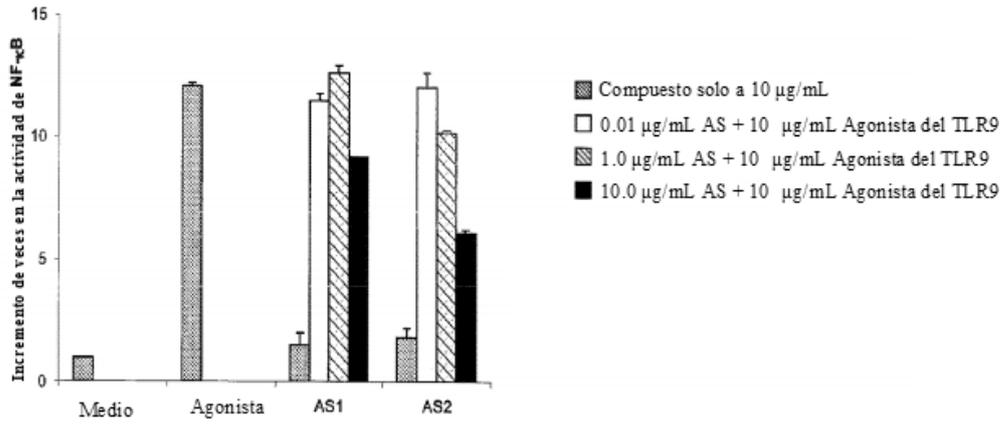


Figura 2B.
Inhibición de la actividad del TLR9

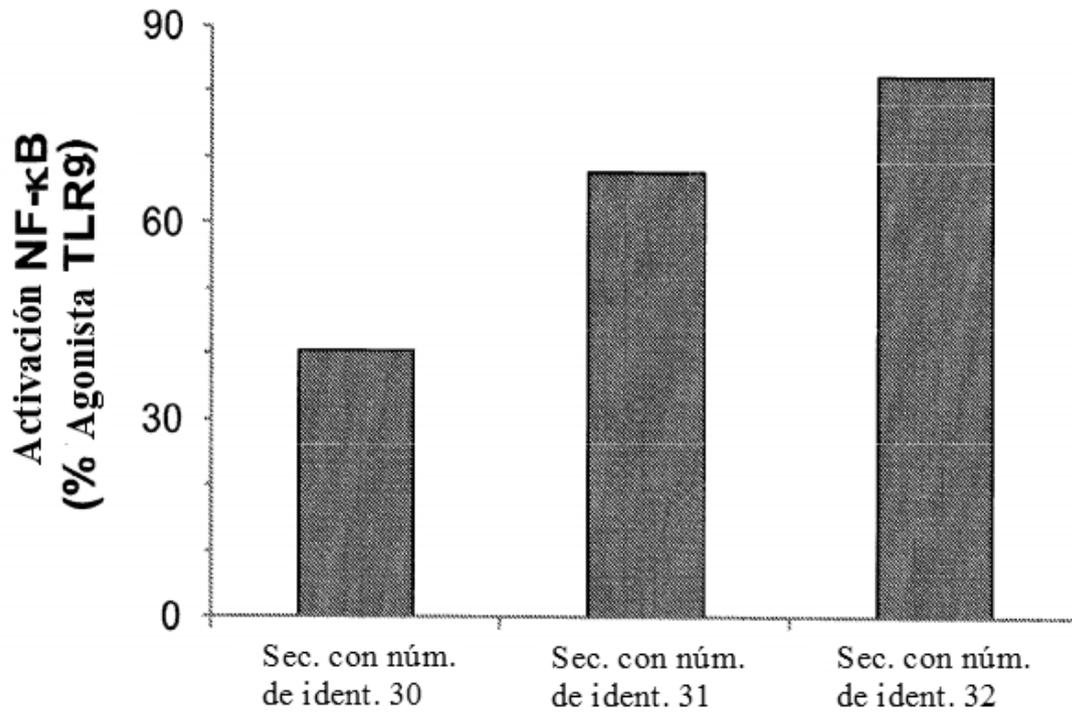


Figura 2C.
Inhibición de la actividad del TLR7

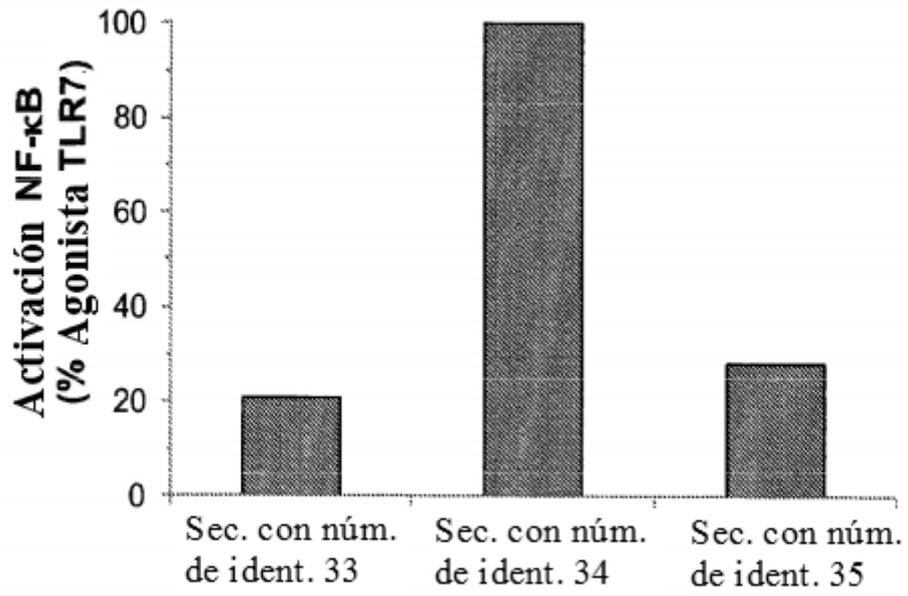


Figura 2D.
Inhibición de la actividad del MyD88

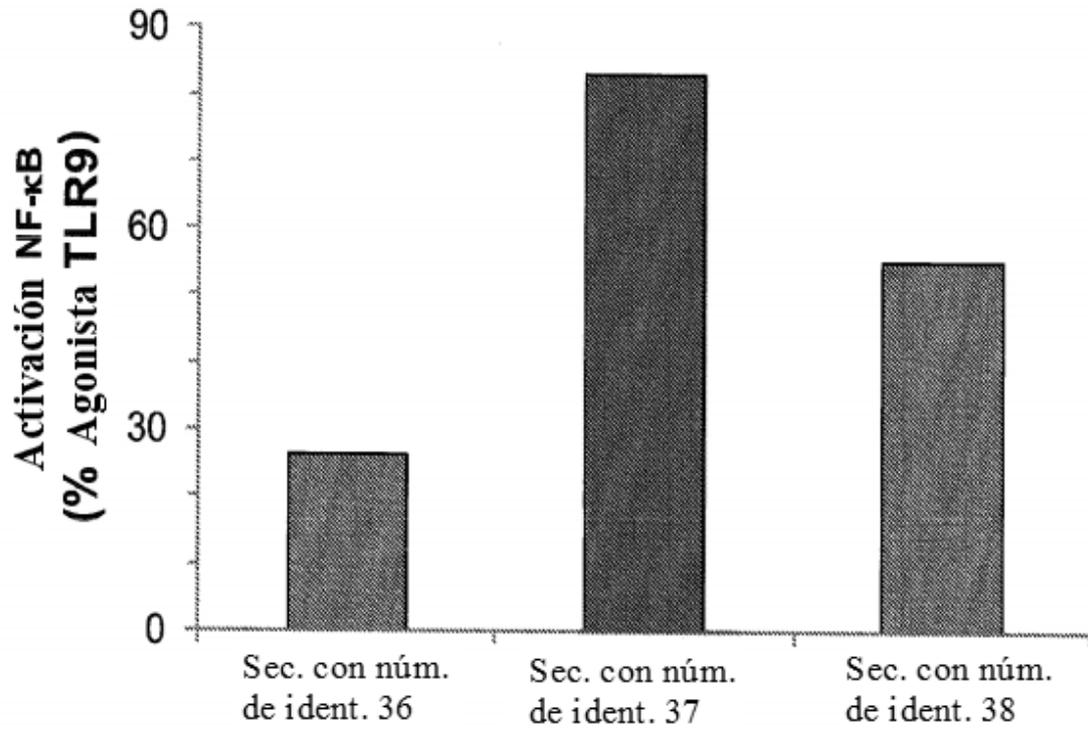


Figura 3

Inhibición de la expresión del TLR9

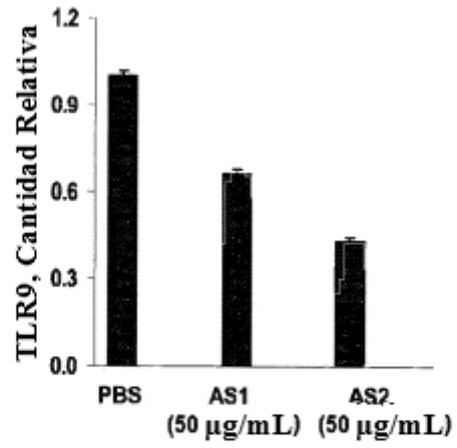


Figura 4

Inhibición de la expresión del TLR9

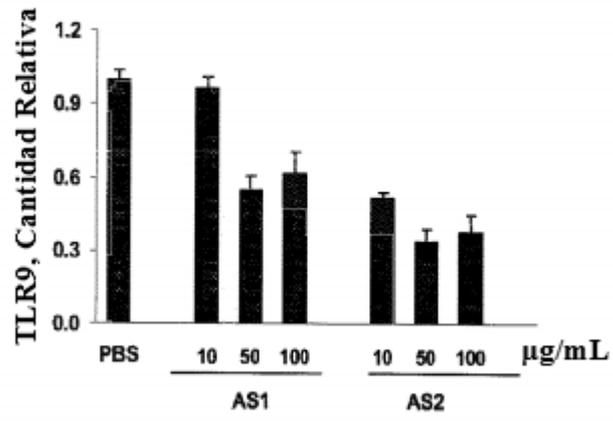


Figura 5A

Inhibición in vivo de la Actividad y Expresión del TLR9

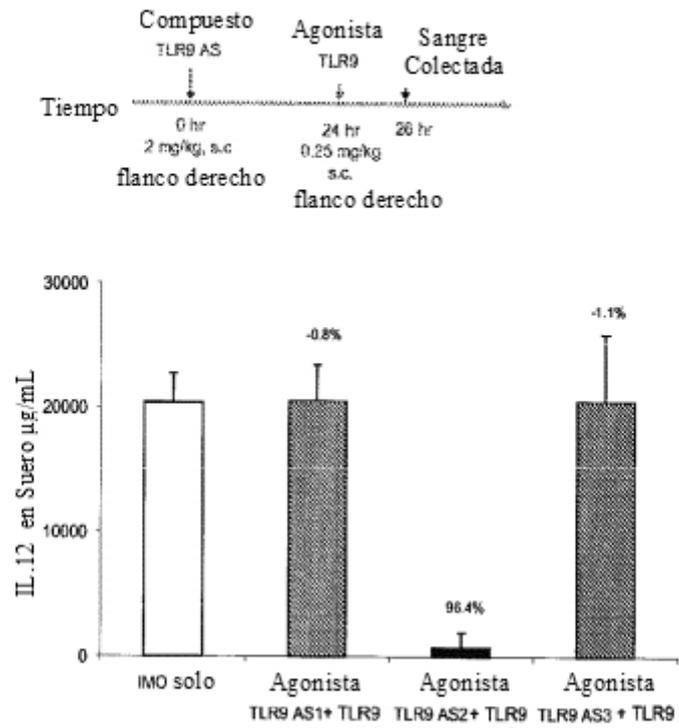


Figura 5B

Inhibición in Vivo de la Actividad y Expresión del TLR9

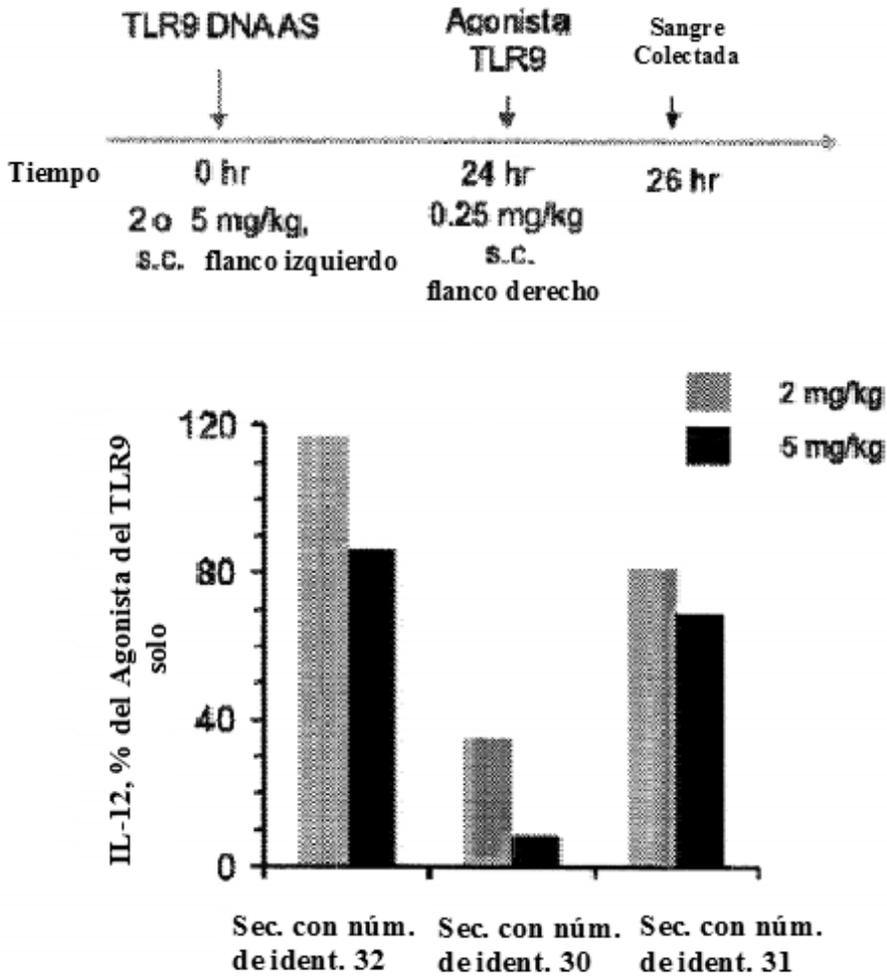


Figura 5C

Duración de la Inhibición in Vivo de la Actividad de MyD88

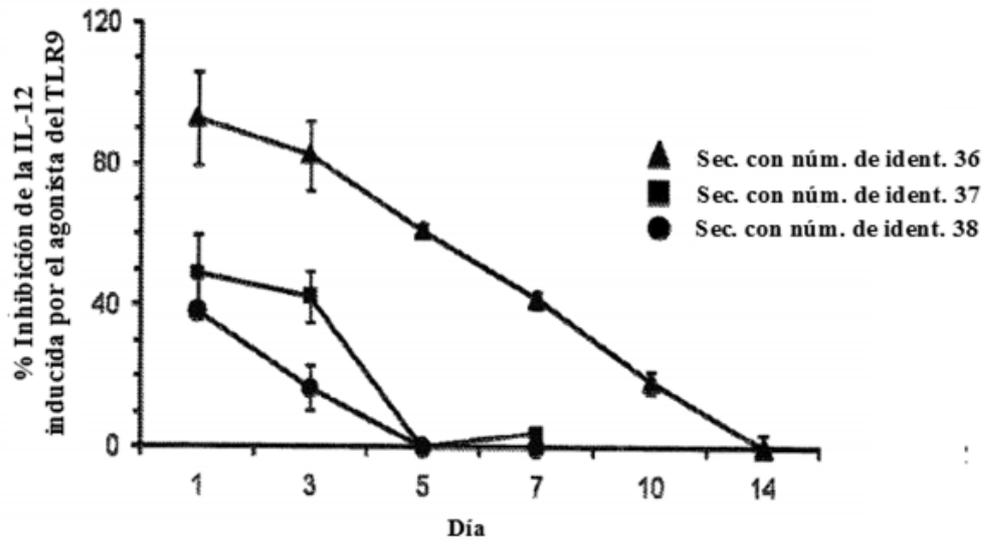


Figura 6

Inhibición in Vivo de la Actividad y Expresión del TLR9

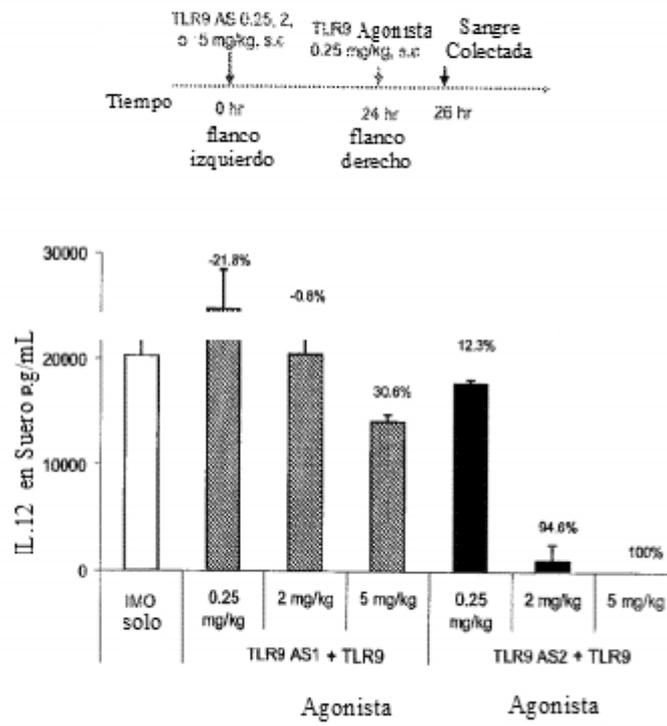


Figura 7

Inhibición in Vivo de la Expresión y Actividad del TLR9

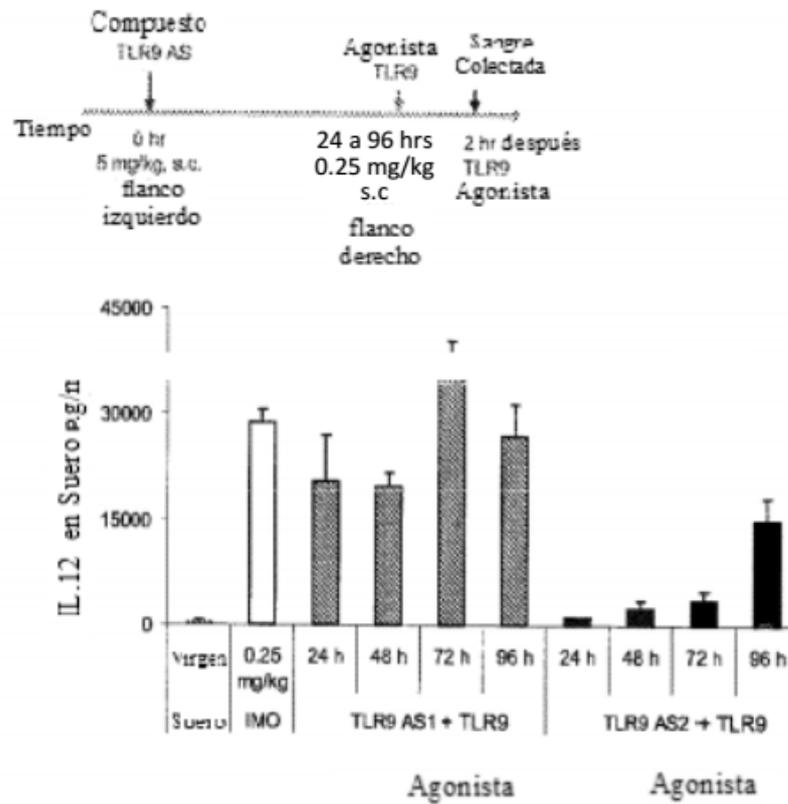


Figura 8A

Inhibición de la Expresión del mRNA del TLR9

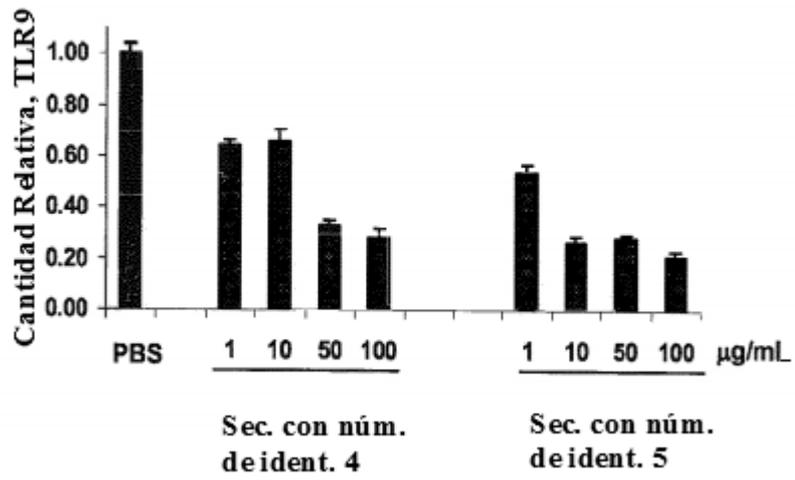


Figura 8B

Inhibición de la Expresión del mRNA del TLR9

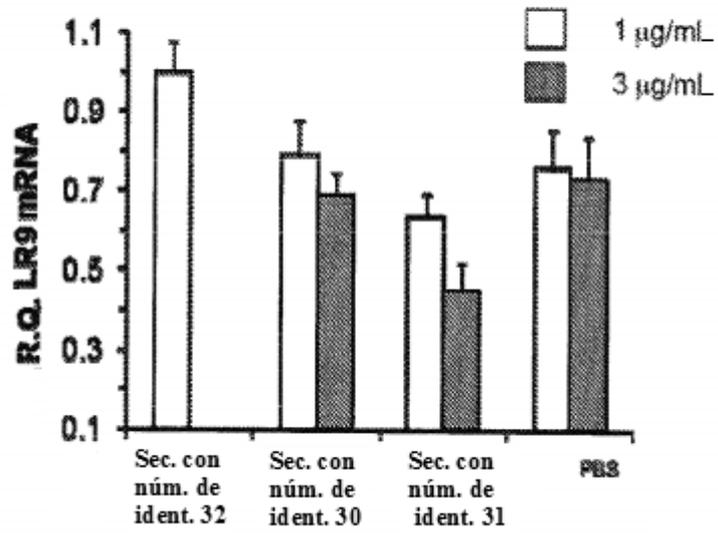


Figura 8C

Inhibición de la Expresión de la Proteína del TLR9

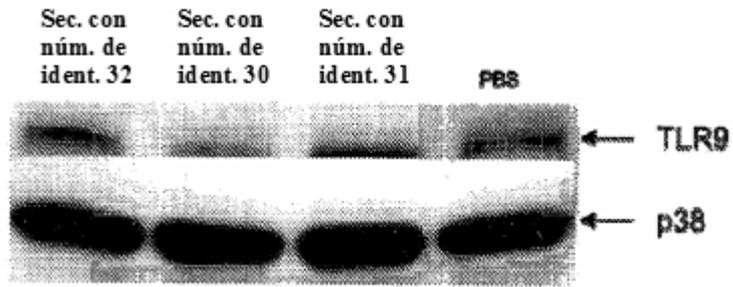


Figura 8D

Inhibición de la Expresión del mRNA del VEGF

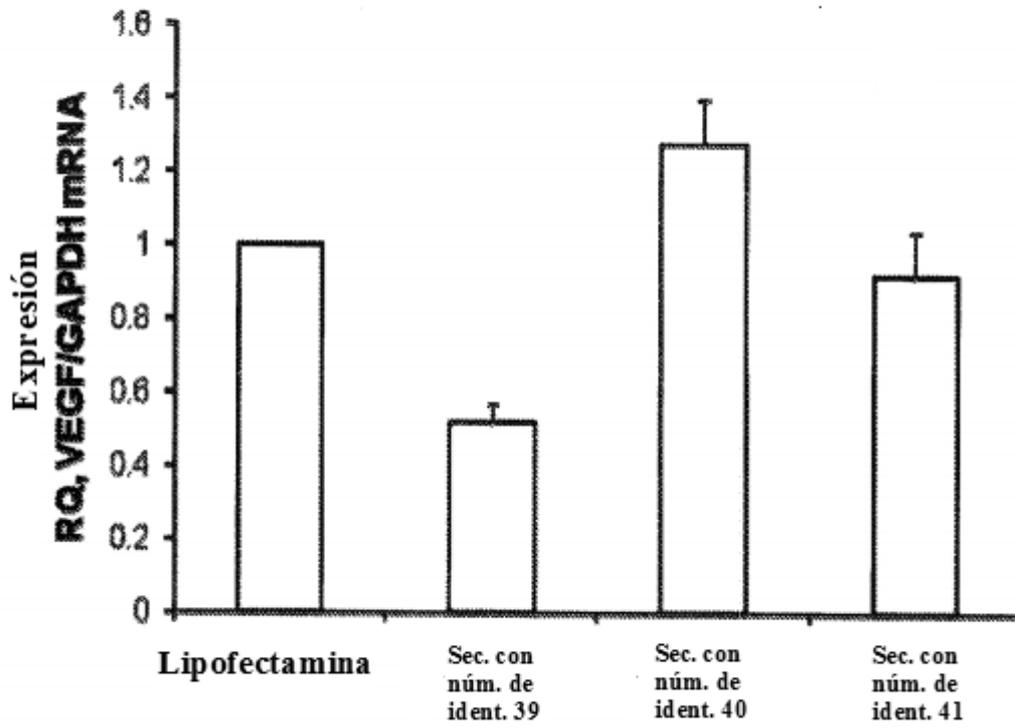


Figura 9

Inhibición de la Expresión del TLR9

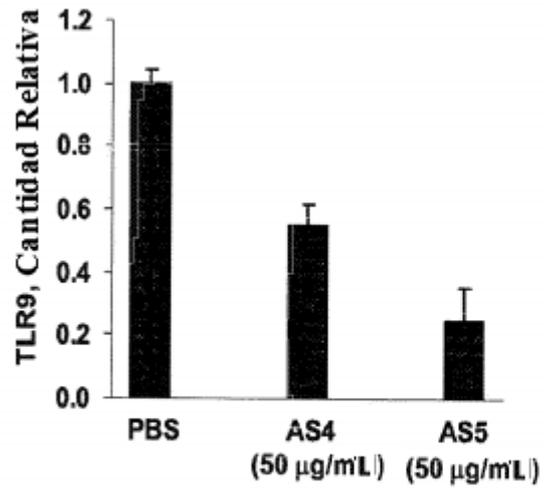


Figura 10

Inhibición de la Expresión del TLR9

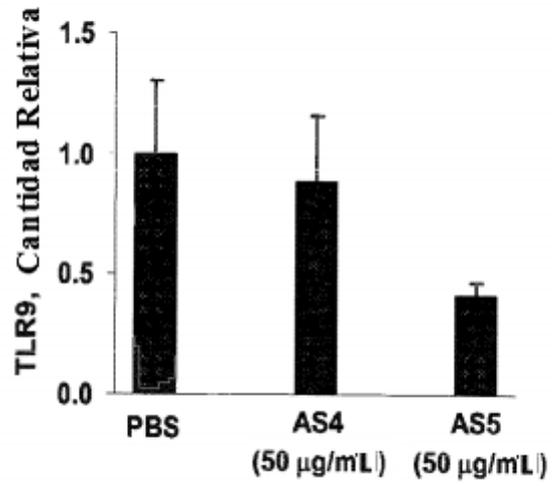


Figura 11

Inhibición in Vivo de la Expresión y Actividad del TLR9

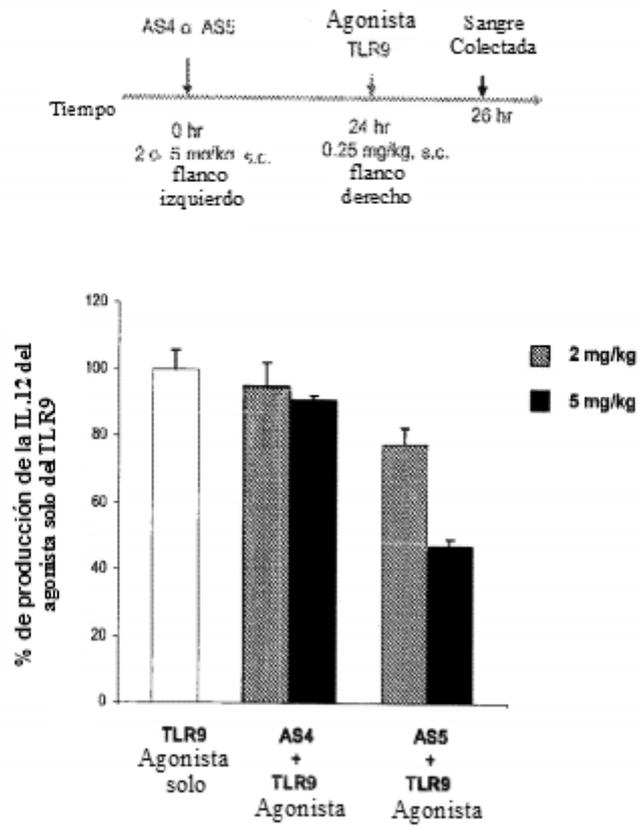


Figura 12

Inhibición de la Expresión y Actividad del TLR7

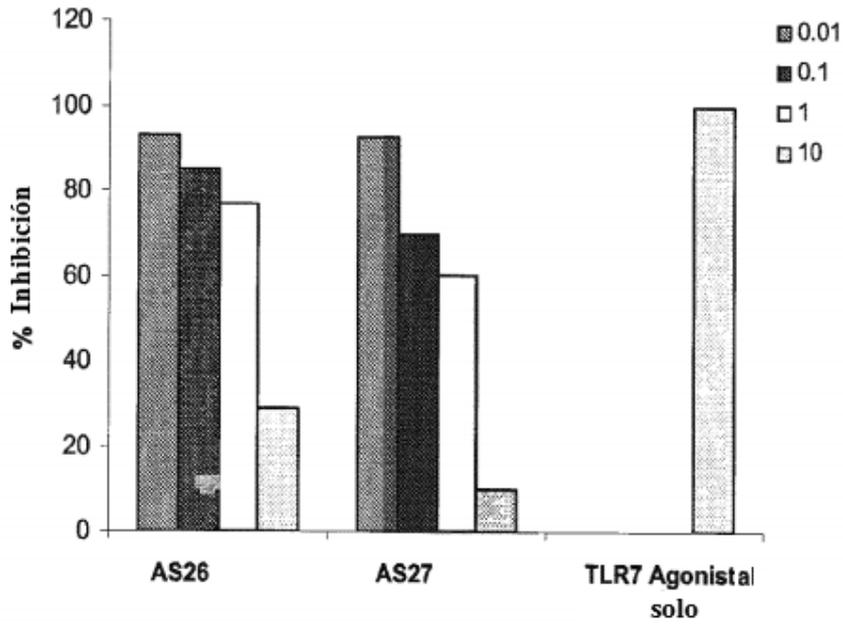


Figura 13

Unión y Escisión Selectiva de Compuestos en base a oligonucleótidos de Acuerdo con la invención por Proteínas asociadas con la Inhibición mediada antisentido de la Expresión de Genes

