

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 898**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2011 E 15185994 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3023496**

54 Título: **Compuestos que modulan la actividad de señalización de las interleucinas 17 y 23**

30 Prioridad:

**13.05.2010 US 334516 P**

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

**06.04.2021**

73 Titular/es:

**SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
215 First Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SCHNELL, FREDERICK, J.;  
IVERSEN, PATRICK, L. y  
MOURICH, DAN, V.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 816 898 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Compuestos que modulan la actividad de señalización de las interleucinas 17 y 23

5 Antecedentes de la invención

Campo técnico

10 La presente invención se refiere, en general, a composiciones y métodos de inhibición de las vías de señalización de IL- 17 y IL-23 y de tratamiento o de prevención de enfermedades mediadas por interleucina- 17 e interleucina-23, tales como enfermedades inmunorrelacionadas e inflamatorias.

Antecedentes

15 Las enfermedades inmunorrelacionadas e inflamatorias implican frecuentemente a vías de múltiples etapas y sistemas biológicos múltiples. La intervención en puntos críticos en una o más de estas vías puede tener un efecto meliorativo o terapéutico. La intervención terapéutica puede ocurrir o por antagonización de un proceso o vía perjudicial o por estimulación de un proceso o vía beneficioso. El paradigma de linfocitos T cooperadores (Th) está ampliamente aceptado para explicar cómo se generan las diferentes respuestas inmunitarias adaptativas (celulares y humorales) para responder apropiadamente a diversos tipos de patógenos microbianos. Se discutieron los procesos que conducen a la diferenciación de linfocitos T intactos en linfocitos Th1 productores de IFN-gamma o Th2 productores de IL-4 mediante el estudio del sistema de linfocitos T cooperadores (Mossman & Coffman)

20 Recientemente, sin embargo, se han descrito varios miembros recientemente descubiertos de la vía de diferenciación de Th. Entre estos, están los linfocitos T reguladores productores de TGF-b o IL-10 (Treg o Tr-1, respectivamente) y los linfocitos Th17 productores de IL-17 (revisado en Korn y Gaffen). Todos estos tipos de linfocitos Th desempeñan funciones significativas y distintas en el control de los diferentes agentes infecciosos, la tolerancia, la resolución de respuestas y el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria. La diferenciación de linfocitos T intactos en un tipo de linfocito Th específico y el acoplamiento de la actividad efectora es un proceso altamente regulado donde el desenlace se determina por una combinación de estímulos derivados de patógeno y factores ambientales derivados del hospedador que incluyen perfiles de citocinas autocrinas y paracrinas que producen señales de retroalimentación positivas y negativas de manera que tengan un tipo de predominancia de respuesta (Zhou). El extenso entendimiento de los diferentes tipos de Th ha introducido un nuevo paradigma que sugiere que es la idoneidad y no la magnitud global de una respuesta inmunitaria la que determina la patogénesis de un organismo o su posterior eliminación.

35 La prolongada inflamación provocada por la desregulación de linfocitos T es común a diversas enfermedades autoinmunitarias. Inicialmente, se creyó que los linfocitos Th1, que median en las respuestas a patógenos intracelulares (por ejemplo, virus), eran responsables de la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias crónicas, que incluyen psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis, miocarditis autoinmunitaria o esclerosis múltiple por activación de macrófagos, exceso de producción de citocinas e inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) autorreactivos. Sin embargo, con el reciente descubrimiento de IL-23, se puso en duda la función de los linfocitos Th1 en la patogénesis autoinmunitaria. Los linfocitos Th17 fueron descubiertos por primera vez cuando se mostró que ratones deficientes en IL-23 (que carecen de expresión de la porción p19 de la citocina heterodimérica) eran resistentes a diversos modelos de enfermedad autoinmunitaria específica de órgano y presentaron una espectacular disminución en la expresión de IL-17 en una subpoblación distinta de linfocitos T CD4+.

40 Así, se estableció que los linfocitos Th17 y IL-23 se encontraban dentro de un eje de inmunidad capaz de causar respuestas destructivas de tejido que incluyen las recientes observaciones de intensas manifestaciones cutáneas, pulmonares y miocárdicas en modelos animales (Rangachari, Mauermann et al. 2006; Carlson, West et al. 2009). El documento de patente WO 2006/088833 A2 desvela anticuerpos contra la interleucina -17F y otros antagonistas de la señalización de IL-17F y usos de los mismos.

45 El documento de patente WO 2005/010044 A2 desvela heterólogos de polipéptidos A/F de IL-17 y usos terapéuticos de los mismos.

55 Se conocen y se han estudiado ampliamente muchas enfermedades inmunorrelacionadas. Sigue existiendo una necesidad de terapias donde no existe ninguna y terapias más eficaces que las actualmente disponibles. Dichas enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias mediadas por inmunidad tales como asma, asma alérgica, enfermedad inflamatoria crónica (incluyendo enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, artritis, dermatitis atópica o psoriasis); enfermedad inflamatoria aguda (por ejemplo, endotoxemia, septicemia, síndrome de choque tóxico o enfermedad infecciosa), artritis reumatoide, enfermedad hepatoiliar, aterosclerosis, promoción del crecimiento tumoral, enfermedad degenerativa de las articulaciones, enfermedad renal mediada por inmunidad, enfermedad respiratoria del adulto (ERA), choque séptico, insuficiencia multiorgánica, lesión inflamatoria pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipersensibilidad de las vías respiratorias, bronquitis crónica, asma alérgica, neumonía bacteriana, psoriasis, eccema, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, síndrome nefrótico, rechazo de aloinjerto de órgano, enfermedad injerto contra huésped (EICH), rechazo de trasplante de riñón, pulmón, corazón, etc., artritis inducida por pared celular estreptocócica (PCE), osteoartritis, gingivitis/periodontitis, queratitis estromal por herpes, cánceres que incluyen de

próstata, renal, colon, ovario, cervical, leucemia, angiogénesis, reestenosis y enfermedad de Kawasaki.

También sigue existiendo una necesidad de modelos animales que permitan el desarrollo de terapias para muchas enfermedades inmunorrelacionadas. Muchos agentes de enfermedad infecciosa manifiestan la enfermedad no directamente del patógeno, sino de la respuesta del hospedador al patógeno. En muchas enfermedades infecciosas la "tormenta de citocinas" asociada a la eliminación del agente infeccioso es responsable de la manifestación de la enfermedad. Dicha categoría de agentes infecciosos son los que provocan la fiebre hemorrágica, que incluye miembros de las familias virales Arenaviridae, Flaviviridae, Filoviridae, Togaviridae, Arteriviridae y Bunyaviridae. Los modelos animales que reproducen la enfermedad humana no están frecuentemente disponibles o tienen poco éxito. Por ejemplo, la replicación viral en un modelo animal sin las secuelas inmunológicas asociadas observadas en seres humanos infectados es un mal modelo de enfermedad humana provocada por el virus. Se necesitan particularmente modelos animales que permitan la perturbación de las vías de señalización de IL-23/17 en el contexto de una enfermedad infecciosa. Además, los modelos animales que imitan con más exactitud la afección humana permitirán el desarrollo de terapias inmunomoduladoras que se dirigen a enfermedades inmunorrelacionadas, que incluyen aquellas más allá del contexto de las enfermedades infecciosas.

Breve descripciones de los dibujos

La Figura 1A muestra una estructura de oligómero de morfolino a modo de ejemplo con un enlace fosforodiamidato;  
 la Figura 1B muestra un oligómero de morfolino como en la Figura 1A, pero donde los enlaces del esqueleto contienen un grupo positivamente cargado en forma de un enlace (piperazino) fosforodiamidato;  
 la Figura 1C muestra un conjugado de un péptido rico en arginina y un oligómero antisentido, según una realización de la invención;  
 las Figuras 1D-G muestran el segmento de la subunidad de repetición de oligonucleótidos de morfolino a modo de ejemplo, designados D a G.  
 La Figura 2 muestra la estructura de exón de los genes IL17RC murinos y humanos con la localización del exón 12 en ambos genes indicada.  
 La Figura 3 muestra la localización de las secuencias de acceso de IL-17RC humano a modo de ejemplo con respecto a los exones 10-12.  
 La Figura 4A muestra la supervivencia de ratones FVB infectados por LCMV CI 13 (LCMV) y tratados con mull-17RC SD12, como se describe en el Ejemplo 2. La Figura 4B muestra los números de copias de ARN viral de LCMV después del tratamiento con IL17RC-SD12.  
 La Figura 5 muestra el análisis bioquímico de la sangre de ratones FVB infectados por LCMV tratados con mull-17RC SD12 en comparación con ratones FVB y B6 infectados por LCMV pero no tratados.  
 La Figura 6 muestra los niveles de IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17 e IFN $\alpha$  en ratones FVB tratados con IL-17RC-SD12 infectados por LCMV, en comparación con ratones FVB y B6 no tratados e infectados.  
 Las Figuras 7A y 7B muestran la letalidad y pérdida de peso, respectivamente, de ratones FVB infectados por LCMV en comparación con ratones C57BL/6 infectados por LCMV.  
 Las Figuras 8A-8E muestran los síntomas hemorrágicos presentados por ratones FVB infectados por LCMV (8A-8C) en comparación con ratones C57BL/6 infectados por LCMV o FVB intactos (8D y 8E, respectivamente).  
 La Figura 9 muestra el análisis bioquímico de la sangre y el perfil hematológico de ratones FVB infectados por LCMV en comparación con ratones C57BL/6 infectados por LCMV o FVB intactos.  
 La Figura 10 muestra el número de copias de ARN viral de LCMV dentro de diversos tejidos tomados de ratones FVB infectados por LCMV en comparación con ratones C57BL/6 infectados por LCMV.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a oligómeros antisentido dirigidos a las vías de señalización de IL-23/17. Están disponibles varias químicas antisentido o de interferencia por ARN y se conocen por los expertos en la técnica. Una característica importante de ciertas químicas antisentido es la capacidad de hibridarse con un ARN diana sin causar la degradación de la diana por RNasa H, como con oligonucleótidos 2'-desoxi ("oligonucleótidos antisentido" denominados en lo sucesivo "AON"). Dichos compuestos también se pueden denominar oligómeros de corte y empalme y cambio (SSO) si alteran el corte y empalme del pre-ARNm y oligómeros supresores de la traducción (TSO) si bloquean la traducción de ARNm. Los expertos en la técnica apreciarán que TSO y SSO incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos modificados en 2' O y ribonucleósidos fosforotioatos, así como ácidos nucleicos peptídicos (PNA), morfolinos, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y otros polímeros que carecen de enlaces basados en ribofuranosilo.

Las realizaciones de la presente invención incluyen, por tanto, métodos de modulación de la actividad de señalización de IL-17 en una célula *ex vivo*, que comprenden poner en contacto la célula con un oligómero antisentido compuesto de subunidades de morfolino unidas por enlaces entre las subunidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad a un carbono 5' exocíclico de una subunidad adyacente, en donde el oligómero contiene entre 10-40 bases y una secuencia de acceso de al menos 10 bases contiguas de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS: 7-12, en donde los oligómeros antisentido de morfolino inducen el salto de exón completo o parcial de uno o más exones de un transcrito de pre-ARNm de IL-17RC, modulando así la actividad

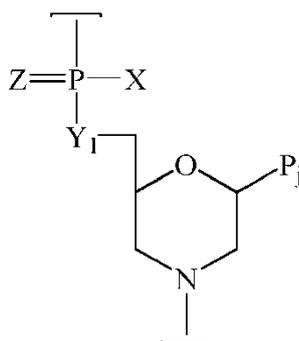
de señalización de IL-17 en la célula. En ciertas realizaciones, el oligómero altera el corte y empalme del transcrito de pre-ARNm y aumenta la expresión de una variante de IL-17RC.

El oligómero induce el salto de exón completo o parcial de uno o más exones del transcrito de pre-ARNm. En algunas realizaciones, el uno o más exones codifican al menos una porción de un dominio de unión a ligando de la proteína, y la variante es una forma de ligando independiente de la proteína. En realizaciones particulares, el uno o más exones codifican al menos una porción de un dominio transmembranario de la proteína, y la variante tiene unión a membrana reducida, solubilidad elevada, o ambos. En otras realizaciones, el uno o más exones codifican al menos una porción de un dominio de señalización de la proteína, y la variante tiene actividad de señalización de IL-17 alterada.

También se incluyen oligómeros antisentido sustancialmente no cargados, compuestos de subunidades de morfolino unidas por enlaces de subunidad que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad a un carbono 5' exocíclico de una unidad adyacente, en donde el oligómero contiene entre 10-40 bases y una secuencia de acceso de al menos 10 bases contiguas de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS: 7-12 en donde el oligómero antisentido de morfolino induce el salto de exón completo o parcial de uno o más exones de un transcrito de pre-ARNm de IL-17RC. En ciertas realizaciones, el oligómero contiene aproximadamente 5 %-50 % de enlaces catiónicos de intersubunidad. En ciertas realizaciones, el oligómero comprende un péptido de vehículo rico en arginina.

En ciertas realizaciones, el péptido se une en su extremo C al extremo 5' del oligómero mediante un conector de uno o dos aminoácidos. En otras realizaciones, el péptido se une en su extremo C al extremo 3' del oligómero mediante un conector de uno o dos aminoácidos. En realizaciones específicas, el conector es AhxβAla, en donde Ahx es ácido 6-aminohexanoico y βAla es β-alanina. En ciertas realizaciones, el péptido se selecciona de SEQ ID NOS: 15-32.

En algunas realizaciones, las unidades de morfolino en el oligómero se unen por enlaces fosfordiamidato, según la estructura:



en donde Z es S u O,

X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> o OR<sup>6</sup>,

Y = O o NR<sup>7</sup>,

Pj es un resto de apareamiento de bases de purina o pirimidina,

y cada dicho enlace se selecciona de:

(a) enlace (a) no cargado, en donde cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se selecciona independientemente de hidrógeno y un alquilo C1 a C4;

(b1) enlace (b1) catiónico, en donde X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> y Y = O, y NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> representa un grupo piperazino sustituido opcional, de forma que R<sup>1</sup>R<sup>2</sup> = -CHRCHRN(R<sup>3</sup>)(R<sup>4</sup>)CHRCHR-, en donde

cada R<sup>4</sup> es H, CH<sub>3</sub> o un par de electrones, y

R<sup>3</sup> se selecciona de H, un alquilo C1 a C4, C(=NH)NH<sub>2</sub>, Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, y [C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>H, en donde Z de Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que tiene enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido que existe de forma natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es 1 a 6;

(b2) enlace catiónico (b2), en donde X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> y Y = O, R<sup>1</sup> = H o CH<sub>3</sub> y R<sup>2</sup> = LNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, en donde L, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se definen como antes, y R<sup>5</sup> es H, un alquilo C1 a C4, o (alcoxi)alquilo inferior; y

(b3) enlace catiónico (b3), en donde Y = NR<sup>7</sup> y X = OR<sup>6</sup>, y R<sup>7</sup> = LNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, en donde L, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se definen como antes, y R<sup>6</sup> es H o un alquilo C1 a C4; y al menos dicho enlace se selecciona de los enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3).

En ciertas realizaciones, cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, en enlaces de tipo (a), es metilo. En algunas realizaciones, al menos

un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H, R<sup>4</sup> es H, CH<sub>3</sub>, o un par de electrones, y R<sup>3</sup> se selecciona de H, CH<sub>3</sub>, C(=NH)NH<sub>2</sub> y C(O)-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, al menos un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H, R<sup>4</sup> es un par de electrones y R<sup>3</sup> se selecciona de C(=NH)NH<sub>2</sub> y C(O)-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, al menos un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H, R<sup>4</sup> es un par de electrones y R<sup>3</sup> se selecciona de C(=NH)NH<sub>2</sub> y C(O)-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>3</sup> es C(O)-L-NHC(NH)NH<sub>2</sub> y L es un hidrocarburo que tiene la estructura -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, donde n es 1 a 12. En ciertas realizaciones, al menos un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H, y cada uno de R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es independientemente H o CH<sub>3</sub>.

También se incluye un oligómero antisentido de morfolino compuesto de subunidades de morfolino unidas por enlaces de subunidad que contienen fósforo que une un nitrógeno del morfolino de una subunidad con un carbono 5' exocíclico de una unidad adyacente, en donde el oligómero contiene entre 10-40 bases y una secuencia de acceso de al menos 10 bases contiguas de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS: 7-12, en donde el oligómero antisentido de morfolino induce el salto de exón completo o parcial de uno o más exones de un transcrito de pre-ARNm de IL-17RC, para su uso en un método para modular la inflamación en el sujeto que comprende administrar dicho oligómero antisentido de morfolino al sujeto, modulando así la inflamación en el sujeto. Las realizaciones particulares incluyen tratar fiebre hemorrágica viral (FHV). En ciertas realizaciones, la FHV se provoca por un virus seleccionado de las familias virales Arenaviridae, Flaviviridae, Filoviridae, Togaviridae, Arteriviridae y Bunyaviridae.

Algunas realizaciones incluyen reducir una respuesta inflamatoria aguda, reducir una respuesta inflamatoria crónica, o ambas. Ciertas realizaciones incluyen modular la activación, secreción de moléculas inflamatorias, proliferación, actividad, migración o adhesión de una o más células inmunitarias o células vasculares. Las realizaciones particulares incluyen modular los niveles o la actividad de una o más moléculas inflamatorias. En ciertas realizaciones, la una o más moléculas inflamatorias comprenden moléculas inflamatorias derivadas de plasma de uno cualquiera o más del sistema del complemento, sistema quinina, sistema de la coagulación o sistema de la fibrinólisis. En ciertas realizaciones, la una o más moléculas inflamatorias comprenden moléculas inflamatorias derivadas de célula de uno cualquiera o más de gránulos de lisosoma, aminas vasoactivas, eicosanoides, citocinas, proteínas de la fase aguda u óxido nítrico.

Ciertas realizaciones incluyen modular una respuesta inflamatoria o afección inflamatoria asociada a uno o más tejidos, sistemas de tejidos u órganos seleccionados de piel, folículos pilosos, sistema nervioso, sistema auditivo u órganos del equilibrio, aparato respiratorio, tejidos gastroesofágico, sistema gastrointestinal, sistema vascular, hígado, vesícula biliar, sistema linfático / inmunitario, aparato urogenital, sistema musculoesquelético, tejido adiposo, mamas y sistema endocrino.

Algunas realizaciones se refieren a tratar inflamación asociada a hipersensibilidad, una afección autoinflamatoria, cáncer, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o tormenta de citocinas. Algunas realizaciones incluyen tratar inflamación asociada a una cualquiera o más de inflamación granulomatosa, inflamación fibrinosa, inflamación purulenta, inflamación serosa o inflamación ulcerativa. Ciertas realizaciones comprenden tratar inflamación asociada a una o más heridas. Las realizaciones específicas se refieren a tratar inflamación asociada a trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC).

Algunas realizaciones se refieren a composiciones farmacéuticas, que comprenden un oligómero antisentido descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

#### *Definiciones*

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por los expertos habituales en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se pueda usar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Por "aproximadamente" se indica una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía en tanto como 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

Un "agonista" se refiere a un agente que intensifica o imita una actividad biológica seleccionada de IL-17 o IL-23. Los ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen transactivación y transrepresión. Se incluyen agonistas parciales y completos.

El término "antagonista" se refiere a un agente que inhibe o atenúa una actividad biológica seleccionada de IL-17 o IL-23. Los ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen la transactivación y transrepresión. Se incluyen antagonistas parciales y completos.

- 5 Por "secuencia codificante" se indica cualquier secuencia de ácidos nucleicos que contribuye a la codificación del producto de polipéptido de un gen. Por el contrario, el término "secuencia no codificante" se refiere a cualquier secuencia de ácidos nucleicos que no contribuye a la codificación del producto de polipéptido de un gen.

10 En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera de otro modo, se entenderá que las palabras "comprender", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento establecido o grupo de etapas o elementos, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

15 Por "que consiste en" se indica que incluye, y se limita a, cualquiera que sea lo que sigue a la expresión "que consiste en". Así, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se indica que incluye cualquier elemento enumerado después de la expresión, y limitado a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos listados. Así, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos listados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o pueden no estar presentes dependiendo de si afectan o no materialmente la actividad o acción de los elementos listados.

20 Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial", en que solo algunos de las bases de ácidos nucleicos son correspondidas según las reglas de apareamiento de bases. O, puede ser complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y la intensidad de la hibridación entre las cadenas de ácido nucleico. Mientras que se desea frecuentemente complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir uno o más pero preferentemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 desapareamientos con respecto al ARN diana. Se incluyen variaciones en cualquier localización dentro del oligómero. En ciertas realizaciones, se prefieren, en general, las variaciones en la secuencia cerca de los extremos de un oligómero a las variaciones en el interior, y si están presentes, normalmente dentro de aproximadamente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

35 Los términos "péptido de penetración celular" o "CPP" se usan indistintamente y se refieren a péptidos de penetración celular catiónicos, también denominados péptidos de transporte, péptidos portadores, péptidos de administración ricos en arginina o dominios de transducción de péptidos. Los péptidos, como se muestra en el presente documento, tienen la capacidad de inducir la penetración celular dentro de 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % de células de una población de cultivos celulares dada, que incluye todos los números enteros intermedios, y permiten la translocación macromolecular dentro de múltiples tejidos *in vivo* tras la administración sistémica.

45 Los términos "oligómero antisentido" o "compuesto antisentido" u "oligonucleótido antisentido" o "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de subunidades cíclicas, cada una de las cuales lleva un resto de apareamiento de bases, unidas por enlaces intersubunidad que permiten que los restos de apareamiento de bases se hibriden con una secuencia diana en un ácido nucleico (normalmente un ARN) por apareamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia diana. Las subunidades cíclicas se pueden basar en ribosa u otro azúcar de pentosa o, en ciertas realizaciones, un grupo morfolino (véase la descripción de oligómeros de morfolino más adelante). También se contemplan ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos de 2'-O-metilo e interferencia por agentes de ARN (agentes de ARNip), y otros agentes antisentido conocidos en la técnica.

50 Dicho oligómero antisentido se puede diseñar para bloquear o inhibir la traducción de ARNm o para inhibir el procesamiento de corte y empalme de pre-ARNm natural, o inducir la degradación de ARNm dirigidos, y se puede decir que "se dirige" u "orienta contra" una secuencia diana con la que se hibrida. En ciertas realizaciones, la secuencia diana incluye una región que incluye un codón de iniciación de AUG de un ARNm, un sitio de corte y empalme de 3' o 5' de un ARNm pre-procesado, un punto de ramificación. La secuencia diana puede estar dentro de un exón o dentro de un intrón. La secuencia diana para un sitio de corte y empalme puede incluir una secuencia de ARNm que tiene su extremo 5' 1 a aproximadamente 25 pares de bases en la dirección 3' de un empalme aceptor de corte y empalme normal en un ARNm pre-procesado (pre-ARNm). Una secuencia diana preferida para un corte y empalme es cualquier región de un ARNm pre-procesado que incluye un sitio de corte y empalme o está contenido completamente dentro de una secuencia codificante de exón o abarca un aceptor de corte y empalme o sitio donante. Es general, se dice que un oligómero se "dirige contra" una diana biológicamente relevante, tal como un ARNm o pre-ARNm de IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-17RC o IL-23R, cuando se dirige contra el ácido nucleico de la diana en el modo descrito anteriormente.

La "vía de señalización de IL-23/17" describe el funcionamiento de proteínas citocina y de receptor de citocina codificadas por los genes IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-17RC e IL-23R también denominados "dianas de señalización de IL-23/17" o "genes de señalización de IL-23/17". El término "gen IL-17" se refiere a una familia de genes de seis genes relacionados pero distintos denominados IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Las dianas preferidas en la práctica de la invención son los genes que codifican IL-17A e IL-17F.

Se incluyen oligonucleótidos antisentido que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en uno o más de SEQ ID NOS: 2-12. También se incluyen variantes de estos oligómeros antisentido, que incluyen oligómeros de variante que tienen 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % (incluyendo todos los números enteros intermedios) de identidad de secuencia u homología de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOS: 2-12, y/o variantes que se diferencian de estas secuencias en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, preferentemente las variantes que modulan la expresión de IL-17RC en una célula. También se incluyen oligonucleótidos de una cualquiera o más de SEQ ID NOS: 2-12, que comprenden un número adecuado de enlaces cargados, como se describe en el presente documento, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 por cada 2-5 enlaces no cargados, tal como aproximadamente 4-5 por cada 10 enlaces no cargados, y/o que comprenden un péptido rico en Arg unido a los mismos, como también se describe en el presente documento.

Los términos "oligómero de morfolino" o "PMO" (oligómero de morfolino de fosforamidato o fosfordiamidato) se refieren a un análogo de oligonucleótidos compuesto de estructuras de subunidad de morfolino, donde (i) las estructuras se unen juntas por enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, preferentemente dos átomos de largo, y preferentemente no cargados o catiónicos, que unen el nitrógeno de morfolino de una subunidad a un carbono 5' exocíclico de una unidad adyacente, y (ii) cada anillo de morfolino posee una purina o pirimidina o un resto de apareamiento de bases equivalente eficaz para unión, por enlace de hidrógeno específico de base, a una base en un polinucleótido. Véase, por ejemplo, la estructura en la Figura 1A, que muestra un tipo de enlace fosfordiamidato preferido. Las variaciones se pueden hacer a este enlace en tanto que no interfieran con la unión o actividad. Por ejemplo, el oxígeno unido al fósforo se puede sustituir con azufre (tiofosfordiamidato). El oxígeno en 5' se puede sustituir con amino o amino sustituido con alquilo inferior. El nitrógeno lateral unido al fósforo puede estar sin sustituir, monosustituido o disustituido con alquilo inferior (opcionalmente sustituido). Véase también la discusión de enlaces catiónicos a continuación. El resto de apareamiento de bases purina o pirimidina normalmente es adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. La síntesis, estructuras y características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las patentes de EE. UU. N° 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063 y 5.506.337, y los documentos de patente WO2008/036127 A2 (enlaces catiónicos) y WO2009/064471 A1 (síntesis mejorada).

El término "análogo de oligonucleótidos" se refiere a un oligonucleótido que tiene (i) una estructura de esqueleto modificada, por ejemplo, un esqueleto distinto del enlace fosfodiéster habitual encontrado en oligo- y polinucleótidos naturales, y (ii) opcionalmente, restos de azúcar modificados, por ejemplo, restos de morfolino en vez de restos de ribosa o desoxirribosa. Los análogos de oligonucleótidos soportan bases capaces de enlace de hidrógeno por apareamiento de bases de Watson-Crick con bases de polinucleótidos habituales, donde el esqueleto análogo presenta las bases de un modo que permita dicho enlace de hidrógeno en un modo específico de secuencia entre la molécula de análogo de oligonucleótido y las bases en un polinucleótido convencional (por ejemplo, ARN monocatenario o ADN monocatenario). Los análogos preferidos son los que tienen un esqueleto que contiene fósforo sustancialmente no cargado.

Un esqueleto que contiene fósforo sustancialmente no cargado en un análogo de oligonucleótidos es uno en el que la mayoría de los enlaces de subunidad, por ejemplo, entre 50-100 %, normalmente al menos 60 % a 100 % o 75 % o 80 % de sus enlaces, no están cargados a pH fisiológico, y contienen un único átomo de fósforo. Los oligonucleótidos antisentido y análogos de oligonucleótidos pueden contener entre aproximadamente 8 y 40 subunidades, normalmente aproximadamente 8-25 subunidades, y preferentemente aproximadamente 12 a 25 subunidades. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos pueden tener complementariedad de secuencias exacta con la secuencia diana o casi complementariedad, como se define a continuación.

Una "subunidad" de un oligonucleótido se refiere a una unidad de nucleótido (o de análogo de nucleótido). El término se puede referir a la unidad de nucleótido con o sin el enlace de intersubunidad unido, aunque, cuando se refiere a un "subunidad cargada", la carga normalmente reside dentro del enlace de intersubunidad (por ejemplo, un enlace fosfato o fosforiato o un enlace catiónico, como se muestra en la Figura 1B).

El resto de apareamiento de bases de purina o pirimidina normalmente es adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. También se incluyen bases tales como piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metiluracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitolinas (por ejemplo, 5-metilcitolina), 5-alquiluridinas (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (por ejemplo 6-metiluridina), propina, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wybutosina, wybutoxosina, 4-acetiluridina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina,  $\beta$ -D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitolina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetiluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metil-N6-

isopenteniladenosina,  $\beta$ -D-manosilqueosina, ácido uridina-5-oxiacético, 2-tiocitidina, derivados de treonina y otros (Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, arriba). Por "bases modificadas" se indica en este aspecto bases de nucleótidos distintas de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), como se ilustra anteriormente; dichas bases se pueden usar en cualquier posición en la molécula antisentido. Los expertos en la técnica apreciarán que dependiendo de los usos de los oligómeros, T y U son intercambiables. Por ejemplo, con otras químicas antisentido tales como oligonucleótidos antisentido de 2'-O-metilo que son más de tipo ARN, las bases T se pueden mostrar como U (véase, por ejemplo, Listado de secuencias).

Una "subunidad de aminoácido" o "resto de aminoácido" se puede referir a un resto de  $\alpha$ -aminoácido (-CO-CHR-NH-) o un resto  $\beta$  u otro resto de aminoácido (por ejemplo, -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHR-NH-), donde R es una cadena lateral (que puede incluir hidrógeno) y n es 1 a 7, preferentemente 1 a 4.

El término "aminoácido que existe de forma natural" se refiere a un aminoácido presente en proteínas encontrado en la naturaleza, tal como los 20 (L)-aminoácidos utilizados durante la biosíntesis de proteínas, así como otras tales como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina. El término "aminoácidos no naturales" se refiere a los aminoácidos no presentes en proteínas encontradas en la naturaleza, ejemplos incluyen beta-alanina ( $\beta$ -Ala), ácido 6-aminohexanoico (Ahx) y ácido 6-aminopentanoico. Los ejemplos adicionales de "aminoácidos no naturales" incluyen, sin limitación, (D)-aminoácidos, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina y similares, que se conocen por un experto en la técnica.

Por "aislado" se indica material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado" u "oligonucleótido aislado," como se usa en el presente documento, se puede referir a un polinucleótido que se ha purificado o retirado de las secuencias que lo flanquean en un estado que existen de forma natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de compuesto terapéutico, tal como un oligómero antisentido o agente de interferencia por ARN (por ejemplo, ARNip), administrado a un sujeto mamífero, ya sea como una dosis única o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado. Para un oligómero antisentido, este efecto normalmente se provoca inhibiendo la traducción o el procesamiento de corte y empalme natural de una secuencia diana seleccionada. Una "cantidad eficaz" dirigida contra un transcrito de IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-17RC o IL-23R también se refiere a una cantidad eficaz para modular la expresión de los genes de señalización IL-23/17.

Por "potencian" o "potenciar", o "incrementar" o "incrementando", o "estimular" o "estimulando", se refiere, en general, a la capacidad de uno o compuestos o composiciones antisentido o de iARN para producir o provocar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos en la dirección 3') en una célula o un sujeto, en comparación con la respuesta provocada por o compuesto no antisentido o un compuesto de control. Una cantidad "incrementada" o "potenciada" normalmente es una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1), por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por el compuesto no antisentido (la ausencia de un agente) o un compuesto de control.

El término "reducir" o "inhibir" se puede referir, en general, a la capacidad de uno o más compuestos antisentido o de iARN de la invención para "disminuir" una respuesta fisiológica o celular relevante, tal como un síntoma de una enfermedad o afección descrita en el presente documento, como se mide según técnicas rutinarias en la técnica del diagnóstico. Las respuestas fisiológicas o celulares relevantes (*in vivo* o *in vitro*) serán evidentes para los expertos en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, reducciones en la inflamación. Una "disminución" en una respuesta puede ser "estadísticamente significativa" en comparación con la respuesta producida por el compuesto no antisentido o una composición de control, y puede incluir una disminución de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %, que incluye todos los números enteros intermedios.

El término "secuencia diana" se refiere a una porción del ARN diana contra el que el oligonucleótido o agente antisentido se dirige, es decir, la secuencia con la que se hibridará el oligonucleótido por apareamiento de bases de Watson-Crick de una secuencia complementaria. En ciertas realizaciones, la secuencia diana puede ser una región contigua de un pre-ARNm que incluye tanto la secuencia diana de intrón como de exón. En ciertas otras realizaciones, la secuencia diana consistirá exclusivamente en cualquiera de las secuencias de intrón o de exón.

El término "secuencia de acceso" o "secuencia de acceso antisentido" se refiere a la secuencia en un oligonucleótido u otro agente antisentido que es complementaria (que significa, además, sustancialmente complementaria) a la secuencia diana en el genoma de ARN. La secuencia entera, o solo una porción, del compuesto antisentido puede ser complementaria a la secuencia diana. Por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene 20-30 bases, aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 pueden ser secuencias de acceso que son complementarias a la región diana. Normalmente, la secuencia de acceso está

formada de bases contiguas, pero alternativamente se puede formar de secuencias no contiguas que cuando se ponen juntas, por ejemplo, desde extremos opuestos del oligonucleótido, constituyen la secuencia que engloba la secuencia diana.

- 5 Se pueden seleccionar secuencias diana y de acceso tal que la unión del compuesto antisentido sea a una región de un pre-ARNm de IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-17RC o IL-23R que provoca el salto de exón de uno o más exones seleccionados en los genes.

10 Las secuencias diana y de acceso se describen como "complementarias" entre sí cuando la hibridación ocurre en una configuración antiparalela. Una secuencia de acceso puede tener complementariedad "próxima" o "sustancial" con la secuencia diana y todavía funcionar para el fin de la presente invención, es decir, todavía puede ser funcionalmente "complementaria". En ciertas realizaciones, un oligonucleótido puede tener como máximo un desapareamiento con la secuencia diana de los 10 nucleótidos, y preferentemente como máximo un desapareamiento de los 20. Alternativamente, un oligonucleótido puede tener al menos 90 % de homología de secuencias, y preferentemente al menos 95 % de homología de secuencias, con las secuencias de acceso antisentido a modo de ejemplo descritas en el presente documento.

20 Un oligonucleótido "se hibrida específicamente" con un polinucleótido diana si el oligómero se hibrida con la diana en condiciones fisiológicas, con una Tm sustancialmente superior a 45 °C, preferentemente al menos 50 °C, y normalmente 60 °C-80 °C o mayor. Dicha hibridación corresponde preferentemente a condiciones de hibridación rigurosas. A una fuerza iónica y pH dados, el Tm es la temperatura a la que el 50 % de una secuencia diana se hibrida con un polinucleótido complementario. Otra vez, dicha hibridación puede ocurrir con "casi" o "sustancial" complementariedad del oligómero antisentido con la secuencia diana, así como con complementariedad exacta.

25 "Homología" se refiere al porcentaje del número de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología se puede determinar usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395). De esta forma, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en el presente documento se podrían comparar por inserción de huecos en el alineamiento, siendo dichos huecos determinados, por ejemplo, por el algoritmo de comparación usado por GAP.

30 Las recitaciones "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia 50 % idéntica a", como se usa en el presente documento, se refieren al grado al que las secuencias son idénticas en una base de nucleótido por nucleótido o una base de aminoácido por aminoácido con respecto a una ventana de comparación. Así, se puede calcular un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias óptimamente alineadas con la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) ocurre en ambas secuencias para dar el número de posiciones equiparadas, dividiendo el número de posiciones equiparadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

45 Los términos usados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es al menos 8 o 10, pero frecuentemente 15 a 18 y frecuentemente al menos 25 unidades de monómero, incluidos nucleótidos y restos de aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden cada uno comprender (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan normalmente comparando secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones de similitud de secuencias locales. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más normalmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen óptimamente. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar por implementaciones computerizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.) o por inspección y el mejor alineamiento (es decir, dando como resultado el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generado por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como se desvela, por ejemplo, por Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Una discusión detallada del análisis de secuencias se puede encontrar en la Unidad 19.3 de Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Una molécula oligomérica (oligómero) "resistente a nucleasa" se refiere a una cuyo esqueleto es sustancialmente resistente a la escisión por nucleasa, en forma no hibridada o hibridada; por nucleasas extracelulares e intracelulares comunes en el cuerpo; es decir, el oligómero muestra poca o ninguna escisión por nucleasa en condiciones normales de nucleasa en el cuerpo al que se expone el oligómero.

Un "heterodúplex" se refiere a un dúplex entre un oligonucleótido antisentido y la porción complementaria de un ARN diana. Un "heterodúplex resistente a nucleasa" se refiere a un heterodúplex formado por la unión de un oligómero antisentido a su diana complementaria, de forma que el heterodúplex sea sustancialmente resistente a la degradación *in vivo* por nucleasas intracelulares y extracelulares, tales como RNasaH, que son capaces de cortar ARN bicatenario/ARN o complejos de ARN/ADN.

Un "evento de unión intracelular específico de base que implica un ARN diana" se refiere a la unión específica de un oligonucleótido antisentido a una secuencia de ARN diana dentro de una célula. La especificidad por base de dicha unión es dependiente de la secuencia. Por ejemplo, un polinucleótido monocatenario se puede unir específicamente a un polinucleótido monocatenario que es complementario en la secuencia.

Como se usa en el presente documento, el término "líquido corporal" engloba una variedad de tipos de muestras obtenidas de un sujeto que incluye, orina, saliva, plasma, sangre, líquido cefalorraquídeo u otra muestra de origen biológico, tal como células de la piel o residuos dérmicos, y se puede referir a células o fragmentos de células suspensos en él, o el medio líquido y sus solutos.

El término "cantidad relativa" se usa donde se hace una comparación entre una medición de prueba y una medición de control. La cantidad relativa de un reactivo que forma un complejo en una reacción es la cantidad que reacciona con un espécimen de prueba, en comparación con la cantidad que reacciona con un espécimen de control. El espécimen de control se puede analizar por separado en el mismo ensayo, o puede ser parte de la misma muestra (por ejemplo, tejido normal que rodea un área maligna en una sección de tejido).

El "tratamiento" de un individuo o una célula es cualquier tipo de intervención proporcionada como un medio para alterar el curso natural de una enfermedad o patología en el individuo o la célula. El tratamiento incluye, pero no se limita a, administración de, por ejemplo, una composición farmacéutica, y se puede realizar ya sea profilácticamente, o posterior al inicio de un acontecimiento patológico o contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección asociada a inflamación, entre otras, descrita en el presente documento.

También se incluyen "tratamientos profilácticos", que se puede referir a reducir la tasa de progresión de la enfermedad o afección que está tratándose, retrasar la aparición de esa enfermedad o afección, o reducir la intensidad de su aparición. "Tratamiento" o "profilaxis" no indica necesariamente la erradicación completa, cura o prevención de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados de la misma.

Un agente es "activamente absorbido por las células de mamífero" cuando el agente puede entrar en la célula por un mecanismo distinto de la difusión pasiva a través de la membrana celular. El agente se puede transportar, por ejemplo, por "transporte activo", con referencia al transporte de agentes a través de una membrana de célula de mamífero por, por ejemplo, un mecanismo de transporte dependiente de ATP, o por "transporte facilitado", con referencia al transporte de agentes antisentido a través de la membrana celular por un mecanismo de transporte que requiere la unión del agente a una proteína de transporte, que entonces facilita el paso del agente unido a través de la membrana. Para el transporte tanto activo como facilitado, los análogos de oligonucleótidos tienen preferentemente un esqueleto sustancialmente no cargado, como se define a continuación.

Alternativamente, el compuesto antisentido se puede formular en una forma complejada, tal como un agente que tiene un esqueleto aniónico complejado con lípidos catiónicos o liposomas, que pueden ser tomados en células por un mecanismo endocitótico. El oligonucleótido antisentido también se puede conjugar, por ejemplo, en su extremo 5' o 3', con un péptido rico en arginina, tal como una porción de la proteína TAT del VIH, poliarginina, o con combinaciones de arginina y otros aminoácidos que incluyen los aminoácidos no naturales ácido 6-aminohexanoico (Ahx) y beta-alanina ( $\beta$ -Ala). Los péptidos de administración ricos en arginina a modo de ejemplo se enumeran como SEQ ID NOS: 15-32. Estos péptidos de administración ricos en arginina a modo de ejemplo facilitan el transporte en la célula hospedadora diana como se ha descrito (Moulton, Nelson *et al.* 2004).

Por tanto, se incluyen métodos de tratamiento de un sujeto en necesidad del mismo, administrando uno o más oligómeros antisentido de la presente invención (por ejemplo, SEQ ID NOS: 2-12, y variantes de los mismos), opcionalmente como parte de una formulación farmacéutica o forma farmacéutica, a un sujeto en necesidad del mismo. Un "sujeto", como se usa en el presente documento, puede incluir cualquier animal que presenta un síntoma, o está en riesgo de presentar un síntoma, que se puede tratar con un compuesto antisentido de la invención, tal como un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una afección inflamatoria. Los sujetos adecuados (pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos.

También se contemplan métodos alternativos de interferencia por ARN (iARN), tales como los que implican a moléculas de ARN bicatenario, o ARNbc. El término "bicatenario" significa dos cadenas de ácido nucleico separadas que comprenden una región en la que al menos una porción de las cadenas son suficientemente complementarias a un enlace de hidrógeno y forman una estructura de dúplex. El término "dúplex" o "estructura de dúplex" se refiere a la región de una molécula bicatenaria en donde las dos cadenas separadas son sustancialmente complementarias, y así se hibridan entre sí.

"ARNbc" se refiere a una molécula de ácido ribonucleico que tiene una estructura de dúplex que comprende dos cadenas de ácido nucleico complementarias y antiparalelas (es decir, las cadenas codificantes y no codificantes). No todos los nucleótidos de un ARNbc deben presentar pares de bases de Watson-Crick; las dos cadenas de ARN pueden ser sustancialmente complementarias. Las cadenas de ARN pueden tener el mismo número o un número diferente de nucleótidos. El término "ARNbc" también incluye "ARNip" o ARN interferente pequeño.

Se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también se puede referir, en el caso de un ARN modificado o sustituto de nucleótido, a un nucleótido modificado, o resto de sustitución sustituto en una o más posiciones. Así, el ARNbc es o incluye una región que es al menos parcialmente complementaria a la diana de ARN. En ciertas realizaciones, el ARNbc es completamente complementario al ARN diana. No es necesario que haya complementariedad perfecta entre los ARNbc y la diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARNbc, o un producto de escisión del mismo, dirijan el silenciamiento específico de secuencia, tal como por escisión de iARN del ARN diana. La complementariedad, o grado de homología con la cadena diana, es la más crítica en la cadena no codificante. Mientras que frecuentemente se desea complementariedad perfecta, particularmente en la cadena no codificante, algunas realizaciones pueden incluir uno o más pero preferentemente 6, 5, 4, 3, 2, o menos desapareamientos con respecto a la diana de ARN. Los desapareamientos son los más tolerados en las regiones terminales, y si están presentes, preferentemente están en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. La cadena codificante solo necesita ser sustancialmente complementaria con la cadena no codificante para mantener el carácter bicatenario global de la molécula.

Como se usa en el presente documento, "ARNbc modificado" se refiere a una molécula de ARNbc que comprende al menos una alteración que la convierte en más resistente a las nucleasas (por ejemplo, proteína cinasa) que una molécula de ARNbc idéntica que reconoce el mismo ARN diana. Los ARNbc modificados pueden incluir un nucleótido protuberante monocatenario y/o al menos un nucleótido sustituido.

Como se usa en el presente documento, un "nucleótido protuberante" se refiere al nucleótido o nucleótidos no apareados que sobresalen de la estructura de dúplex cuando un extremo 3' de una cadena de ARN se extiende más allá del extremo 5' de la otra cadena complementaria, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no existen nucleótidos no apareados en ese extremo del ARNbc, es decir, sin nucleótido protuberante. Un ARNbc "de extremos romos" es un ARNbc que es bicatenario en su longitud entera, es decir, ningún nucleótido protuberante en ningún extremo de la molécula.

El término "par de bases terminal" como se usa en el presente documento se refiere al último par de bases de nucleótidos en un extremo de la región de dúplex de una molécula bicatenaria. Por ejemplo, si un ARNbc u otra molécula es de extremos romos (es decir, no tiene nucleótidos protuberantes), los últimos pares de bases de nucleótido en ambos extremos de la molécula son pares de bases terminales. Si un ARNbc u otra molécula tiene un nucleótido protuberante en uno o ambos extremos de la estructura de dúplex, el (los) último(s) par(es) de bases de nucleótidos inmediatamente adyacentes al (a los) nucleótido(s) protuberante(s) son el par de bases terminal en ese (esos) extremo(s) de la molécula.

También se incluyen sistemas de administración de vector que son capaces de expresar las secuencias de salto de exón dirigidas al gen de señalización IL17/23 oligoméricas de la presente invención, tal como vectores que expresan una secuencia de polinucleótidos que comprende una cualquiera o más de SEQ ID NOS: 2-12, o variantes de la misma, como se describe en el presente documento, o que expresan una secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una o más de las secuencias diana (por ejemplo, SEQ ID NO:1).

Por "vector" o "construcción de ácidos nucleicos" se indica una molécula de polinucleótido, preferentemente una molécula de ADN derivada, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura o virus, en que un polinucleótido se puede insertar o clonar. Un vector contiene preferentemente uno o más sitios de restricción únicos y pueden ser capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora definida que incluye una célula o tejido diana o una célula progenitora o tejido de la misma, o ser integrables con el genoma del hospedador definido de forma que la secuencia clonada sea reproducible. Por consiguiente, el vector puede ser un vector autónomamente replicante, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido circular lineal o cerrado, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la auto-replicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el (los) cromosoma(s) en el que se ha integrado.

Un sistema de vector o de construcción de ácidos nucleicos puede comprender un único vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se va a introducir el vector. En el presente caso, el vector o construcción de ácidos nucleicos es preferentemente uno que es operativamente funcional en una célula de mamífero, tal como una célula de músculo. El vector también puede incluir un marcador de selección, tal como un antibiótico o gen de resistencia a fármaco, o un gen indicador (es decir, proteína verde fluorescente, luciferasa), que se puede usar para la selección o identificación de transformantes o transfectantes adecuados. Los sistemas de administración a modo de ejemplo pueden incluir sistemas de vector viral (es decir, transducción mediada por virus) que incluyen, pero no se limita a, vectores retrovirales (por ejemplo, lentivirales), vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados y vectores del virus del herpes, entre otros conocidos en la técnica.

El término "operativamente unido" como se usa en el presente documento significa situar una secuencia codificante de oligómeros bajo el control regulador de un promotor, que entonces controla la transcripción del oligómero.

Un gen no mutante o producto génico es el que se observa más frecuentemente en una población y así se diseña arbitrariamente la forma "normal" o "no mutante" del gen.

"Alquilo" se refiere a un radical monovalente completamente saturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede estar ramificado, ser lineal o cíclico (cicloalquilo). Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-butilo, t-butilo, n-heptilo, isopropilo, ciclopropilo, ciclopentilo, etilciclopentilo y ciclohexilo. En general, se prefieren grupos alquilo que tienen uno a seis átomos de carbono, denominados "alquilo inferior", y se ejemplifican por metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, isoamilo, n-pentilo e isopentilo. En una realización, alquilo inferior se refiere a alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>.

"Alquenilo" se refiere a un radical monovalente insaturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser ramificado, lineal o cíclico. El grupo alquenilo puede estar monoinsaturado o poliinsaturado. En general, se prefieren grupos alquenilo que tienen uno a seis átomos de carbono, denominados "alquenilo inferior".

"Alquinilo" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado de cadena lineal o ramificado que contiene desde 2 hasta 18 carbonos que comprende al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos incluyen sin limitación etinilo, propinilo, iso-propinilo, butinilo, iso-butinilo, terc-butinilo, pentinilo y hexinilo. El término "alquinilo inferior" se refiere a un grupo alquinilo, como se define en el presente documento, que contiene entre 2 y 8 carbonos.

"Cicloalquilo" se refiere a un radical alquilo mono- o poli-cíclico. Los ejemplos incluyen sin limitación ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

"Ariilo" se refiere a un radical monovalente aromático sustituido o sin sustituir que tiene, en general, un único anillo (por ejemplo, fenilo) o dos anillos condensados (por ejemplo, naftilo). Este término incluye grupos heteroarilo, que son grupos de anillo aromático que tienen uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo, tal como furilo, pirrolilo, piridilo e indolilo. Por "sustituido" se indica que uno o más hidrógenos del anillo en el grupo arilo se sustituyen por un haluro tal como flúor, cloro o bromo; con un grupo alquilo inferior que contiene uno o dos átomos de carbono; nitro, amino, metilamino, dimetilamino, metoxi, halometoxi, halometilo o haloetilo. Los sustituyentes preferidos incluyen halógeno, metilo, etilo y metoxi. En general, se prefieren grupos arilo que tienen un único anillo.

"Aralquilo" se refiere a un alquilo, preferentemente alquilo inferior (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, más preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), sustituyente que está sustituido además con un grupo arilo; ejemplos son bencilo (-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) y fenetilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

"Tioalcoxi" se refiere a un radical de fórmula -SRc donde Rc es un radical alquilo como se define en el presente documento. El término "tioalcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi, como se define en el presente documento, que contiene entre 1 y 8 carbonos.

"Alcoxi" se refiere a un radical de la fórmula -ORd donde Rd es un radical alquilo como se define en el presente documento. El término "alcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi, como se define en el presente documento, que contiene entre 1 y 8 carbonos. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, sin limitación, metoxi y etoxi.

"Alcoxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi.

"Carbonilo" se refiere al radical -C(=O)-.

"Guanidinilo" se refiere al radical H<sub>2</sub>N(C=NH<sub>2</sub>)-NH-.

"Amidinilo" se refiere al radical H<sub>2</sub>N(C=NH<sub>2</sub>)CH-.

"Amino" se refiere al radical -NH<sub>2</sub>.

"Alquilamino" se refiere a un radical de fórmula -NHRd o -NRdRd donde cada Rd es, independientemente, un radical alquilo como se define en el presente documento. El término "alquilamino inferior" se refiere a un grupo alquilamino, como se define en el presente documento, que contiene entre 1 y 8 carbonos.

5 "Heterociclo" significa un anillo monocíclico de 5 a 7 miembros, o bicíclico de 7 a 10 miembros, heterocíclico que está o saturado, insaturado, o es aromático, y que contiene desde 1 hasta 4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, que incluye anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos anteriores está condensado con un anillo de benceno. El  
10 heterociclo se puede unir por cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Preferentemente, los átomos de anillo incluyen 3 a 6 átomos de carbono. Dichos heterociclos incluyen, por ejemplo, pirrolidina, piperidina, piperazina y morfolina.

15 Los heterociclos incluyen heteroarilos como se define a continuación. Así, además de los heteroarilos enumerados a continuación, los heterociclos también incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hydantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiopiranilo y similares.

20 "Heteroarilo" significa un anillo de heterociclo aromático de 5 a 10 miembros y que tiene al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contiene al menos 1 átomo de carbono, que incluye tanto sistemas de anillos mono- como bicíclicos. Los heteroarilos representativos son piridilo, furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, quinolinilo, pirrolilo, indolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinolinilo, ftalazinilo y quinazolinilo.

25 El término "sustituido", con respecto a un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo, aralquilo o alcarilo, se refiere a la sustitución de un átomo de hidrógeno con un sustituyente que contiene heteroátomo tal como, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, tiol, alquiltio, amino, alquilamino, imino, oxo (ceto), nitro, ciano, o diversos ácidos o ésteres tales como carboxílico, sulfónico o fosfónico.

30 El término "sustituido", particularmente con respecto a un grupo alquilo, alcoxi, tioalcoxi o alquilamino, se refiere a la sustitución de un átomo de hidrógeno en el carbono con un sustituyente que contiene heteroátomo, tal como, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, tiol, alquiltio, amino, alquilamino, imino, oxo (ceto), nitro, ciano, o diversos ácidos o ésteres tales como carboxílico, sulfónico, o fosfónico. También se puede referir a la sustitución de un átomo de  
35 hidrógeno en un heteroátomo (tal como un hidrógeno de amina) con un grupo que contiene alquilo, carbonilo u otro carbono.

40 En ciertas realizaciones, los términos "alquilo opcionalmente sustituido", "alqueno opcionalmente sustituido", "alcoxi opcionalmente sustituido", "tioalcoxi opcionalmente sustituido", "alquilamino opcionalmente sustituido", "alquilo inferior opcionalmente sustituido", "alqueno inferior opcionalmente sustituido", "alcoxi inferior opcionalmente sustituido", "tioalcoxi inferior opcionalmente sustituido", "alquilamino inferior opcionalmente sustituido" y "heterociclo opcionalmente sustituido" significan que, cuando están sustituidos, al menos un átomo de hidrógeno está sustituido por un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O), se sustituyen dos átomos de hidrógeno. A este respecto, los sustituyentes incluyen: deuterio, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido, cicloalquilo  
45 opcionalmente sustituido, oxo, halógeno, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOMRx y -SOMNRxRy, en donde m es 0, 1 o 2, Rx y Ry son iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido o cicloalquilo  
50 opcionalmente sustituido y cada uno de dicho alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido y los sustituyentes cicloalquilo opcionalmente sustituidos se pueden sustituir adicionalmente con uno o más de oxo, halógeno, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOMRx y -SOMNRxRy.

55 A continuación se trata la selección de secuencias de acceso capaces de modular la expresión de los componentes de la vía de señalización de IL-23/17.

#### 60 GENES INACTIVADOS

65 La divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de que los oligómeros antisentido dirigidos a IL-17RC son capaces de prevenir la muerte en un modelo letal de infección por el virus de la fiebre hemorrágica (VHF). Se contempla plenamente que las estrategias de acceso antisentido similares para otros componentes de la vía de señalización de IL-23/17 que incluyen dianas de ARNm o pre-ARNm para los genes IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-17RC o IL-23R producirán efectos de la modulación inmunitaria similares. Dentro de la familia de IL-17, se pueden inactivar IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Las realizaciones específicas inactivan IL-17A y/o IL-17F. Las

secuencias de pre-ARNm de estos genes diana se conocen en la técnica. Se incluyen y describen a continuación dianas para las citocinas IL-23/17 y sus receptores.

Se ha informado de numerosas funciones inmunorreguladoras para la familia de citocinas IL-17, en parte debido a su capacidad para inducir una variedad de moléculas de señalización inmunitaria. Por ejemplo, la señalización de IL-17 induce respuestas proinflamatorias, y se asocia comúnmente a respuestas alérgicas. La señalización de IL-17 induce la producción de una variedad de citocinas, quimiocinas y prostaglandinas, que incluyen IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, GRO- $\alpha$ , MCP-1 y PGE<sub>2</sub>, de una variedad de tipos de células, tales como fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos y macrófagos. La función de IL-17 también es esencial para un subconjunto de linfocitos T CD4+ denominados linfocitos T colaboradores 17 (Th17). Debido a estas actividades y actividades relacionadas, se ha unido la familia de IL-17 a muchas enfermedades relacionadas con la inmunidad/autoinmunitarias, que incluyen artritis reumatoide, asma, lupus, rechazo del aloinjerto e inmunidad antitumoral, entre otras descritas en el presente documento y conocidas en la técnica.

La señalización de IL-23 desempeña una función fundamental en la respuesta inflamatoria contra la infección. La señalización de IL-23 también promueve la regulación por incremento de la metaloproteasa de matriz MMP9, aumenta la angiogénesis, reduce la infiltración de linfocitos T CD8+ y participa en el desarrollo de tumores cancerosos. Junto con IL-6 y TGF- $\beta$ 1, la señalización de IL-23 estimula linfocitos T CD4+ intactos para diferenciar en un subconjunto particular de células denominados linfocitos Th17, que son distintos de los linfocitos Th1 y Th2 clásicos. Los linfocitos Th17 producen IL-17, una citocina proinflamatoria que potencia la sensibilización de los linfocitos T y estimula adicionalmente la producción de moléculas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , NOS-2, y diversas quimiocinas. En estas y otras vías, las vías de señalización de IL-23 e IL-17 funcionan frecuentemente juntas para modular una variedad de respuestas inflamatorias, y debido a su relación, también pueden contribuir a una variedad de estados inmunitarios disfuncionales cuando sus actividades de señalización no son apropiadamente reguladas.

#### SELECCIÓN DE DIANAS

En ciertas realizaciones, los genes que codifican las dianas de señalización de IL-17 son las dianas antisentido o de iARN de la presente invención. Un gen a modo de ejemplo que forma la base la evidencia experimental que soporta este aspecto de invención es el gen del receptor C de IL-17 (IL-17RC). La estructura de exón de los genes IL-17RC murinos y humanos se muestra en la Figura 2 junto con la estructura de IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-23R humano y sus números de acceso de GenBank asociados. Los experimentos que soportan la invención se realizaron en ratones usando oligonucleótidos antisentido que dirigen el sitio donante de corte y empalme del exón 12 del pre-ARNm de IL-17RC murino (mulL-17RC-SD12; SEQ ID NO: 13) y se lista en la Tabla 1 como SEQ ID NO: 13. Las secuencias a modo de ejemplo para la inactivación del gen IL-17RC humano se enumeran a continuación como SEQ ID NOs: 2-12. La localización de estas secuencias de acceso con respecto a los exones de IL-17RC y uniones de corte y empalme se muestra en la Figura 3.

En ciertas realizaciones, los exones en la mitad del extremo carboxi del gen receptor son candidatos para la selección como dianas de la invención. Los exones diana a modo de ejemplo mostrados en la Figura 2 son instructivos de la selección de secuencias diana y el diseño de oligómeros de direccionamiento para otros genes IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-17RC o IL-23R. Listado como SEQ ID NO: 1 en el Listado de secuencias está una región de pre-ARNm de IL-17RC humano que consiste en 70 bases de intrón 9 en la dirección 5' del exón 10 y que se extiende a través de las bases de los exones 11 y 12 y 70 en el intrón 11. Esta es una de las varias secuencias diana preferidas para la práctica de la invención en seres humanos. Muchas secuencias diana en esta región de pre-ARNm de IL-17RC tienen el potencial de inducir el salto de exón del exón adyacente. Las secuencias de acceso a modo de ejemplo se enumeran en la Tabla 1 como SEQ ID NOs 2 - 12. Los expertos en la técnica en la práctica de la invención pueden identificar y usar secuencias de acceso análogas para otros genes de señalización de IL-17.

En ciertas realizaciones, se diseñan secuencias de acceso antisentido que se van a hibridar con una región de una o más de las secuencias diana listadas en la Tabla 1, tal como un exón, un intrón, un empalme exón-intrón, o una unión de corte y empalme. Ciertas realizaciones pueden elegir secuencias intrónicas proximales, que incluyen las secuencias que son inmediatamente adyacentes a un exón (por ejemplo, dentro de aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 nucleótidos de una unión de corte y empalme). Ciertas realizaciones pueden elegir secuencias completamente exónicas, que incluyen las secuencias exónicas que están proximales a la unión de corte y empalme (por ejemplo, dentro de aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 nucleótidos de una unión de corte y empalme), así como aquellas hacia el centro de un exón. En ciertas realizaciones, las secuencias antisentido se diseñan para saltar exones seleccionados de un gen de señalización de IL-17, y producir un ARNm alterado (normalmente por delección) que puede codificar una proteína con función alterada, una proteína no funcional o el ARNm alterado se puede degradar mediante degradación mediada por mutaciones terminadoras (NMD). Las dianas a modo de ejemplo para el salto de exones incluyen exones que codifican dominios funcionales conocidos tales como dominios transmembranarios, dominios de unión a ligando o dominios de señalización, en el caso de receptores y dominios de unión a receptor en el caso de genes de señalización de IL-17. También se contempla el direccionamiento de cualquier combinación de dichos exones o dominios.

En ciertas realizaciones, se puede modular una función particular de los genes de señalización IL-/17 por dicho enfoque. Por ejemplo, ciertas realizaciones incluyen el direccionamiento de exones seleccionados de genes de señalización de IL-17 tales como IL-17RC para alterar (por ejemplo, deleccionar) al menos una porción de un dominio asociado a sus actividades de señalización y así modular estas actividades. En el presente documento se desvelan disposiciones que aumentan o agonizan las actividades de señalización de un gen de señalización IL-17 tal como IL-17RC. En el presente documento se desvelan además disposiciones que disminuyen o antagonizan la señalización de actividades de un gen de señalización IL-17 tal como IL-17RC.

En el presente documento se desvelan además disposiciones en donde la secuencia de acceso es complementaria a al menos una porción del exón 1, 2, o 3 de IL-17 humana, o una secuencia intrónica proximal. Se desvela además en el presente documento una disposición en donde la secuencia de acceso es complementaria a al menos una porción del exón 1, 2, o 3 de IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F. Se desvela además en el presente documento una disposición en donde la secuencia de acceso es complementaria a al menos una porción del exón 1, 2, o 3 de IL-17A o IL-17F. Se desvela además en el presente documento una disposición en donde la secuencia de acceso es complementaria a al menos una porción del exón 1, 2, 3 o 4 de IL-23 humana, o una secuencia intrónica proximal. En el presente documento se desvelan además disposiciones en donde la secuencia de acceso es complementaria a al menos una porción del exón 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de IL-17RA humana, o una secuencia intrónica proximal.

En el presente documento se desvelan ciertas disposiciones, en donde la secuencia de acceso es complementaria a al menos una porción del exón 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 de IL-17RC humana, o a secuencia intrónica proximal. En realizaciones específicas, la secuencia de acceso es complementaria a al menos una porción del exón 10, 11 o 12 de IL-17RC humana. En el presente documento se desvelan además disposiciones más específicas, en donde la secuencia de acceso es complementaria a una unión de corte y empalme del exón 10, 11 o 12 de IL-17RC humana. En el presente documento también se desvelan oligómeros antisentido en los que la secuencia de acceso es complementaria a una secuencia completamente intra-exónica del exón 10, 11 o 12 de IL-17RC humana. Como se desvela en el presente documento, en disposiciones específicas, un oligonucleótido antisentido contiene o consiste en una secuencia de acceso seleccionada de SEQ ID NOS: 2-14. Como se desvela en el presente documento, en ciertas disposiciones, la secuencia de acceso es complementaria a al menos una porción del exón 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 de IL-23R, o una secuencia intrónica proximal.

Las secuencias de acceso antisentido seleccionadas se pueden hacer más cortas, por ejemplo, aproximadamente 10-12 bases, o más largas, por ejemplo, aproximadamente 40 bases, e incluyen un pequeño número de desapareamientos, en tanto que la secuencia sea suficientemente complementaria para efectuar la traducción, corte y empalme y/u otra forma de inhibición tras la hibridación con la diana, y forma con el ARN diana, un heterodúplex que tiene una Tm de 45 °C o mayor.

En ciertas realizaciones, el grado de complementariedad entre la diana y la secuencia de acceso antisentido es suficiente para formar un dúplex estable. Se desvela en el presente documento que la región de complementariedad de los oligómeros antisentido con la secuencia de ARN diana puede ser tan corta como 8-11 bases, pero preferentemente tiene 12-15 bases o más, por ejemplo, 12-20 bases, o 12-25 bases, que incluye todos los números enteros entre estos intervalos. Un oligómero antisentido de aproximadamente 14-15 bases es, en general, suficientemente largo para tener una secuencia complementaria única en el ARNm o pre-ARNm diana. En ciertas realizaciones, se puede requerir una longitud mínima de bases complementarias para lograr la Tm de unión requerida, como se trata más adelante.

En ciertas realizaciones, pueden ser adecuados oligómeros tan largos como 40 bases, donde al menos un número de bases mínimo, por ejemplo, 10-12 bases, es complementario a la secuencia diana. En general, sin embargo, la captación facilitada o activa en células se optimiza a longitudes de oligómeros inferior a aproximadamente 30. Para los oligómeros de PMO, descritos más adelante, un equilibrio óptimo de la estabilidad y captación de unión, en general, ocurre a longitudes de 18-25 bases. Se incluyen oligómeros antisentido (por ejemplo, PNAs, LNAs, 2'-OMe, MOE) y oligómeros de PMO que consisten en aproximadamente 10, 11, 12, 13, 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 bases, en que al menos aproximadamente 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 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 bases contiguas o no contiguas son complementarias a una secuencia diana seleccionada, tal como la secuencia diana a modo de ejemplo de SEQ ID NO: 1, o variantes de la misma.

En ciertas realizaciones, los oligómeros antisentido pueden ser 100 % complementarios a la secuencia diana del gen de señalización IL-17, o pueden incluir desapareamientos, por ejemplo, para acomodar variantes, en tanto que un heterodúplex formado entre el oligómero y la secuencia diana sea suficientemente estable para resistir a la acción de nucleasas celulares y otros modos de degradación que pueden ocurrir *in vivo*. Se tratan más adelante los esqueletos de oligómeros que son menos susceptibles a la escisión por nucleasas. Los desapareamientos, si están presentes, son menos desestabilizantes hacia las regiones terminales del dúplex híbrido que en el centro. El número de desapareamientos permitidos dependerá de la longitud del oligómero, el porcentaje de pares de bases de G:C en el dúplex, y la posición del (de los) desapareamiento(s) en el dúplex, según los principios bien entendidos de la estabilidad del dúplex. Aunque dicho oligómero antisentido no es necesariamente 100 % complementario a la

secuencia diana, es eficaz para unirse estable y específicamente a la secuencia diana, de forma que se module una actividad biológica de la diana de ácido nucleico, por ejemplo, la expresión de la(s) proteína(s) de señalización IL-17.

La estabilidad del dúplex formado entre un oligómero y una secuencia diana es una función de la  $T_m$  de unión y la susceptibilidad del dúplex a la escisión enzimática celular. La  $T_m$  de un compuesto antisentido con respecto al ARN de la secuencia complementaria se puede medir por métodos convencionales, tales como los descritos por Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp.107-108 o como se describe en Miyada C.G. y Wallace R.B., 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques, Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107. En ciertas realizaciones, el oligómero antisentido puede tener una  $T_m$  de unión, con respecto a un ARN de secuencia complementaria, superior a la temperatura corporal y preferentemente superior a 50 °C. Se prefieren  $T_m$  en el intervalo 60-80 °C o mayor. Según principios bien conocidos, la  $T_m$  de un compuesto de oligómero, con respecto a un híbrido de ARN basado en complementario, se puede aumentar aumentando la relación de bases apareadas C:G en el dúplex, y/o aumentando la longitud (en pares de bases) del heterodúplex. Al mismo tiempo, para los fines de optimización de la captación celular, puede ser ventajoso limitar el tamaño del oligómero. Por este motivo, se prefieren, en general, los compuestos que muestran alta  $T_m$  (50 °C o mayor) a una longitud de 25 bases o menos con respecto a los que requieren más de 25 bases para altos valores de  $T_m$ .

En ciertas realizaciones, tales como oligómeros de PMO, se puede potenciar la actividad antisentido de un oligómero usando una mezcla de enlaces fosfordiamidato no cargados y catiónicos, como se ejemplifica en la Figura 1B. El número total de enlaces catiónicos en el oligómero puede variar desde 1 hasta 10 (incluyendo todos los números enteros intermedios), y estar intercalados en todo el oligómero. Preferentemente, el número de enlaces cargados es al menos 2 y no superior la mitad de los enlaces totales del esqueleto, por ejemplo, entre 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 enlaces positivamente cargados, y preferentemente cada enlace cargado se separa a lo largo del esqueleto en al menos 1, 2, 3, 4 o 5 enlaces no cargados. La actividad antisentido de diversos oligómeros se puede medir *in vitro* fusionando la región diana del oligómero con el extremo 5' de un gen indicador (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga) y luego midiendo la inhibición de la traducción de los transcritos de ARN del gen de fusión en ensayos de traducción libres de células. Se pueden potenciar las propiedades inhibitorias de los oligómeros que contienen una mezcla de enlaces no cargados y catiónicos entre, aproximadamente, dos a 100 veces en los ensayos de traducción libres de células.

Las secuencias antisentido a modo de ejemplo para inducir el salto de exón de los exones 10, 11 y 12 del pre-ARNm de IL-17RC humana se muestran a continuación en la Tabla 1. El ARN diana se enumera como SEQ ID NO: 1 en el Listado de secuencias y las secuencias de acceso antisentido individuales se nombran según la posición del primer nucleótido diana desde el extremo 5' del ARN diana.

Tabla 1. Secuencias de acceso antisentido a modo de ejemplo

Nombre	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
huIL-17RC,24,108	CACCCTCCCTGAAGGGCAGATGT	2 <sup>1</sup>
huIL-17RC,24,213	AGAGGTTCTGGTGTGCGCGGGGGT	3 <sup>1</sup>
huIL-17RC,24,319	TCCCCACCCGAGCCCGCCAGCAC	4 <sup>1</sup>
huIL-17RC,24,371	GTCCACAGTGACGTTCTCCAGGA	5 <sup>1</sup>
huIL-17RC,24,384	CTGCTTCACTTACGTCCACAGTGA	6 <sup>1</sup>
huIL-17RC,24,477	ACTCGAGAACCTTCTGTGGAAAGA	7
huIL-17RC,24,515	CTGAACACAGAGGTTAGGGTGGCC	8
huIL-17RC,24,532	ATGCACCCCTTTCTGACCTGAACA	9
huIL-17RC,24,545	CCAGCCCAGCACTATGCACCCCTT	10
huIL-17RC,17,522	CTGAACACAGAGGTTAG	11
muIL-17RC,22	CTGGACACAGAGGTTGG	12
huIL-17RC,22,523	TCTGACCTGAACACAGAGGTTA	131
muIL-17RCS12,17	TCTGACCTGGACACAGAGGTTG	141
<sup>1</sup> no según la presente invención		

#### COMPUESTOS DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO

Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención normalmente (a) tienen la capacidad de ser activamente absorbidos por células de mamífero, y (b) una vez absorbidos, forman un dúplex con el ARN diana con una  $T_m$  superior a aproximadamente 45 °C. En ciertas realizaciones, el esqueleto de oligómero puede estar sustancialmente no cargado, y, preferentemente, se puede reconocer como un sustrato para el transporte activo o facilitado a través de la membrana celular. La capacidad del oligómero para formar un dúplex estable con el ARN diana también se puede referir a otras características del esqueleto de oligómero, que incluyen la longitud y el grado de complementariedad del oligómero antisentido con respecto a la diana, la relación entre G:C y A:T de

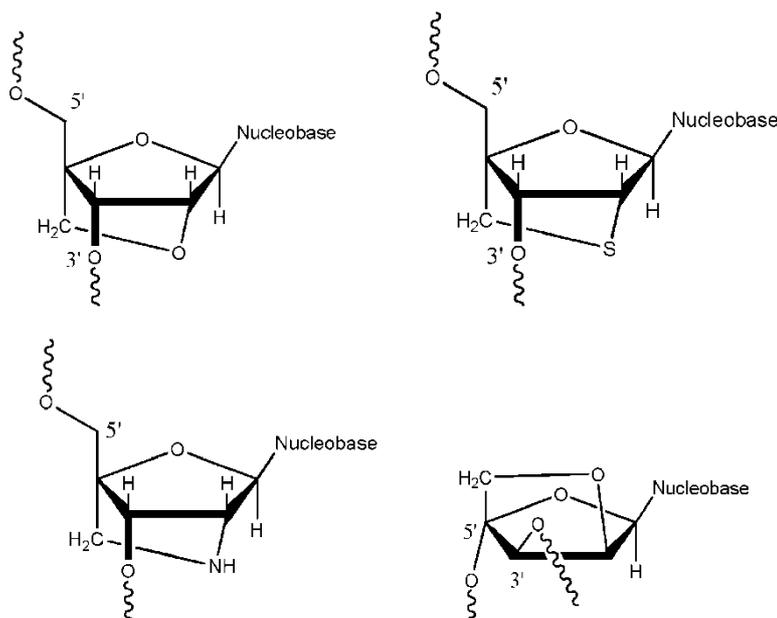
desapareamientos de bases y las posiciones de cualquier base de emparejamiento incorrecto. La capacidad del oligómero antisentido para resistir a las nucleasas celulares puede promover la supervivencia y por último lugar la administración del agente al citoplasma de la célula. Las secuencias de acceso de oligómeros antisentido a modo de ejemplo de la invención que usan la química del esqueleto de PMO se enumeran anteriormente en la Tabla 1. En general, las químicas de PNA y LNA utilizan oligómeros de direccionamiento más cortos debido a su intensidad de unión a diana relativamente alta en comparación con oligómeros de PMO y 2'O-Me.

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) son análogos de ADN en los que el esqueleto es estructuralmente homomorfo con un esqueleto de desoxirribosa, que consiste en unidades de N-(2-aminoetil)glicina a las que se fijan las bases de pirimidina o purina. Los PNAs que contienen bases naturales de pirimidina y purina se hibridan con oligonucleótidos complementarios que obedecen las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick e imitan al ADN en términos del reconocimiento de pares de bases (Egholm, Buchardt *et al.* 1993). El esqueleto de PNA se forma por enlaces peptídicos en vez de enlaces fosfodiéster, que hace que sean muy aptos para aplicaciones antisentido (véase la estructura más adelante). El esqueleto no está cargado, dando como resultado dúplex de PNA/ADN o PNA/ARN que presentan estabilidad térmica superior a la normal. Los PNA no son reconocidos por las nucleasas o proteasas.

Los PNA se producen sintéticamente usando cualquier técnica conocida en la técnica. El PNA es un análogo de ADN en el que un esqueleto de poliamida sustituye el anillo de ribosa del fosfato tradicional del ADN.

A pesar de un cambio estructural radical en la estructura natural, el PNA es capaz de unión específica de secuencia en una forma de hélice a ADN o ARN. Las características de PNA incluyen una alta afinidad de unión a ADN o ARN complementario, un efecto desestabilizante provocado por el desapareamiento de bases individuales, resistencia a nucleasas y proteasas, hibridación con ADN o ARN independiente de la concentración de sales y formación de triplex con ADN de homopurina. Panagene™ ha desarrollado sus monómeros de PNA de Bts patentados (Bts; grupo benzotiazol-2-sulfonilo) y proceso de oligomerización patentado. La oligomerización de PNA usando monómeros de PNA Bts está compuesta por ciclos repetitivos de desprotección, acoplamiento y terminación. Las patentes de Panagene sobre esta tecnología incluyen los documentos de patente US 6969766, US 7211668, US 7022851, US 7125994, US 7145006 y US 7179896. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. N° 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Se puede encontrar más enseñanza de los compuestos de PNA en Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497.

Los compuestos de oligonucleótido de la presente invención también pueden contener subunidades de "ácido nucleico bloqueado" (LNA). Las estructuras de LNA se conocen en la técnica: por ejemplo, Wengel, *et al.*, *Chemical Communications* (1998) 455; *Tetrahedron* (1998) 54, 3607, y *Accounts of Chem. Research* (1999) 32, 301; Obika, *et al.*, *Tetrahedron Letters* (1997) 38, 8735; (1998) 39, 5401, y *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008)16, 9230.



Los compuestos de la invención pueden incorporar uno o más LNA; en algunos casos, los compuestos pueden estar completamente compuestos de LNA. Se conocen en la técnica los métodos para la síntesis de subunidades de LNA de nucleósidos individuales y su incorporación en oligonucleótidos: patentes de EE. UU. 7.572.582; 7.569.575; 7.084.125; 7.060.809; 7.053.207; 7.034.133; 6.794.499; y 6.670.461. Los conectores de intersubunidad típicos

incluyen restos fosfodiéster y fosforotioato; alternatively, se pueden emplear conectores que no contienen fósforo. Una realización preferida es un compuesto que contiene LNA donde cada subunidad de LNA se separa por una subunidad de ADN (es decir, un nucleótido de desoxirribosa). Los compuestos preferidos adicionales están compuestos de subunidades alternas de LNA y ADN donde el conector de intersubunidad es fosforotioato.

Una estructura de oligómero preferida emplea subunidades basadas en morfolino que llevan restos de apareamiento de bases, unidos por enlaces no cargados, como se ha descrito anteriormente. Especialmente se prefiere un oligómero de morfolino unido a fosfordiamidato sustancialmente no cargado. Los oligonucleótidos de morfolino, que incluyen oligómeros antisentido, se detallan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N° 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063 y 5.506.337 del mismo solicitante, y en el documento de patente WO2009/086469 A2.

Ciertas propiedades de las subunidades basadas en morfolino incluyen: la capacidad para ser unidas en una forma oligomérica por enlaces de esqueleto no cargados estables; la capacidad para soportar una base de nucleótido (por ejemplo, adenina, citosina, guanina o uracilo) de forma que el polímero formado se pueda hibridar con un ácido nucleico diana de base complementaria, que incluye ARN diana, con alta  $T_m$ , incluso con oligómeros tan cortos como 10-14 bases; la capacidad del oligómero para ser activamente transportado en células de mamífero; y la capacidad del heterodúplex oligómero:ARN para resistir a la degradación por RNasa.

Los ejemplos de oligonucleótidos de morfolino que tienen enlaces de esqueleto que contienen fósforo se ilustran en las Figs. 1A-1C. Especialmente se prefiere un oligonucleótido de morfolino unido por fosfordiamidato, como se muestra en la Figura 1B, que se modifica, según un aspecto de la presente invención, para contener grupos positivamente cargados en preferentemente 5 %-50 % o 10 %-50 % de sus enlaces de esqueleto. Los oligonucleótidos de morfolino con enlaces de esqueleto no cargados, que incluyen oligonucleótidos antisentido, se detallan, por ejemplo, en (Summerton y Weller 1997) y en las patentes de EE. UU. N° 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063 y 5.506.337 del mismo solicitante, y en el documento de patente WO2009/064471A1.

Las propiedades de las subunidades basadas en morfolino incluyen: 1) la capacidad de unirse en una forma oligomérica por enlaces de esqueleto no cargados o positivamente cargados estables; 2) la capacidad de soportar una base de nucleótido (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo e hipoxantina) de forma que el polímero formado se pueda hibridar con un ácido nucleico diana de base complementaria, que incluye ARN diana, valores de  $T_m$  por encima de aproximadamente 45 °C en oligonucleótidos relativamente cortos (por ejemplo, 10-15 bases); 3) la capacidad del oligonucleótido para ser activamente o pasivamente transportado en células de mamífero; y 4) la capacidad del heterodúplex de oligonucleótido antisentido:ARN para resistir a la degradación por RNasa y RNasaH, respectivamente.

Las estructuras de esqueleto a modo de ejemplo para los oligonucleótidos antisentido de la materia reivindicada incluyen los tipos de subunidad de morfolino mostrados en las Figs. 1D-1G, cada uno unido por un enlace de subunidad que contiene fósforo no cargado o positivamente cargado. La Fig. 1D muestra un enlace que contiene fósforo que forma el esqueleto de unidades de repetición de cinco átomos, donde los anillos de morfolino se unen por un enlace fosfoamida de 1 átomo. La Fig. 1E muestra un enlace que produce un esqueleto de unidades de repetición de 6 átomos. En esta estructura, el átomo Y que une el 5' morfolino al grupo fósforo puede ser azufre, nitrógeno, carbono o, preferentemente, oxígeno. El resto X lateral del fósforo puede ser flúor, un alquilo o alquilo sustituido, un alcoxi o alcoxi sustituido, un tioalcoxi o tioalcoxi sustituido, o nitrógeno sin sustituir, monosustituido, o disustituido, que incluye estructuras cíclicas, tales como morfollinas o piperidinas. El alquilo, alcoxi y tioalcoxi incluyen preferentemente 1-6 átomos de carbono. Los restos Z son azufre u oxígeno, y preferentemente son oxígeno.

Los enlaces mostrados en las Figs. 1F y 1G se diseñan para esqueletos de longitud de 7 unidades de átomo. En la estructura 1F, el resto X es como en la Estructura 1E, y el resto Y puede ser metileno, azufre o preferentemente oxígeno. En la Estructura 1G, los restos X e Y son como en la estructura 1E. Los oligonucleótidos de morfolino particularmente preferidos incluyen los compuestos de estructuras de subunidad de morfolino de la forma mostrada en la Fig. 1E, donde  $X = NH_2$ ,  $N(CH_3)_2$ , o 1-piperazina u otro grupo cargado,  $Y = O$ , y  $Z = O$ .

Como se observa anteriormente, el oligonucleótido sustancialmente no cargado se puede modificar, según un aspecto de la invención, para incluir enlaces cargados, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 por cada 2-20 enlaces no cargados, y más preferentemente como aproximadamente 1-3 por cada 10 enlaces no cargados. En ciertas realizaciones, se puede observar una mejora óptima en la actividad antisentido cuando aproximadamente 20 % de los enlaces de esqueleto son catiónicos. En ciertas realizaciones, la mejora se puede observar con un pequeño número, por ejemplo, 10-20 % de enlaces catiónicos, o donde el número de enlaces catiónicos está en el intervalo 50-80 %, tal como aproximadamente 60 %.

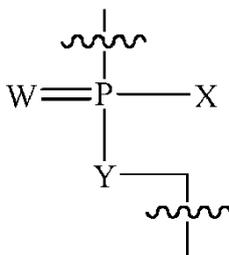
La mejora observada con las cargas del esqueleto catiónico añadido se puede mejorar más, en algunos casos, distribuyendo la mayor parte de las cargas próximas a la "región central" de los enlaces del esqueleto del oligonucleótido antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido 20-mero con 8 enlaces de esqueleto catiónico, que

tiene al menos 70 % de estos enlaces cargados localizados en los 10 enlaces más centrados.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido se pueden preparar por síntesis en fase sólida escalonada, empleando los métodos detallados en las referencias citadas anteriormente, y más adelante con respecto a la síntesis de oligonucleótidos que tienen una mezcla o enlaces de esqueleto no cargados y catiónicos. En algunos casos, puede ser conveniente añadir restos químicos adicionales al compuesto antisentido, por ejemplo, para potenciar la farmacocinética o para facilitar la captura o la detección del compuesto. Dicho resto se puede unir covalentemente, normalmente a un extremo del oligómero, según métodos de síntesis habituales. Por ejemplo, la adición de un resto de polietilenglicol u otro polímero hidrófilo, por ejemplo, uno que tiene 10-100 subunidades monoméricas, puede ser útil en mejorar la solubilidad. Uno o más grupos cargados, por ejemplo, grupos cargados aniónicos tales como un ácido orgánico, pueden potenciar la captación de células.

Se puede unir un resto indicador, tal como fluoresceína o un grupo radiomarcado, para fines de detección. Alternativamente, la marca indicadora unida al oligómero puede ser un ligando, tal como un antígeno o biotina, capaz de unir un anticuerpo marcado o estreptavidina. En la selección de un resto para la unión o modificación de un compuesto antisentido se desea, por supuesto, en general, seleccionar compuestos químicos de grupos que son biocompatibles y probablemente que son tolerados por un sujeto sin efectos secundarios no deseables.

Como se observa anteriormente, se pueden construir ciertos de los compuestos antisentido para contener un número seleccionado de enlaces catiónicos intercalados con enlaces no cargados del tipo descrito anteriormente. Los enlaces de intersubunidad, tanto no cargados como catiónicos, son preferentemente enlaces que contienen fósforo, que tienen la estructura:



donde

W es S u O, y preferentemente es O,

X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> o OR<sup>6</sup>,

Y = O o NR<sup>7</sup>,

y cada dicho enlace en el oligómero se selecciona de:

(a) enlace (a) no cargado, donde cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;

(b1) enlace (b1) catiónico, donde X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> y Y = O, y NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> representa un grupo piperazino opcionalmente sustituido, de forma que R<sup>1</sup>R<sup>2</sup> = -CHRCHR<sup>3</sup>(R<sup>4</sup>)CHRCHR-, donde

cada R es independientemente H o CH<sub>3</sub>,

R<sup>4</sup> es H, CH<sub>3</sub>, o un par de electrones, y

R<sup>3</sup> se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo, CH<sub>3</sub>, C(=NH)NH<sub>2</sub>, Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> y [C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>H, donde: Z es C(O) o un enlace directo, L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud, preferentemente hasta 12 átomos, y más preferentemente hasta 8 átomos de longitud, que tiene enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido que existe de forma natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es 1 a 6, preferentemente 1 a 4;

(b2) enlace catiónico (b2), donde X = NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> y Y = O, R<sup>1</sup> = H o CH<sub>3</sub>, y R<sup>2</sup> = LNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, donde L, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son como se han definido anteriormente, y R<sup>5</sup> es H, alquilo inferior o (alcoxi)alquilo inferior; y

(b3) enlace catiónico (b3), donde Y = NR<sup>7</sup> y X = OR<sup>6</sup>, y R<sup>7</sup> = LNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, donde L, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son como se han definido anteriormente, y R<sup>6</sup> es H o alquilo inferior;

y al menos dicho enlace se selecciona de los enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3).

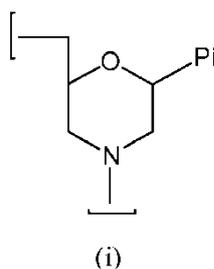
En ciertas realizaciones, un oligómero puede incluir al menos dos enlaces seguidos de tipo (a) (es decir, enlaces no cargados). En realizaciones adicionales, al menos 5 % de los enlaces en el oligómero son enlaces catiónicos (es decir, tipo (b1), (b2), o (b3)); por ejemplo, 10 % a 60 %, y preferentemente 20-50 % de los enlaces pueden ser enlaces catiónicos.

En una realización, al menos un enlace es de tipo (b1), donde, preferentemente, cada R es H, R<sup>4</sup> es H, CH<sub>3</sub>, o un par de electrones, y R<sup>3</sup> se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo, CH<sub>3</sub>, C(=NH)NH<sub>2</sub> y C(O)-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>.

Las dos últimas realizaciones de R<sup>3</sup> proporcionan un resto guanidino, ya sea directamente unido al anillo de piperazina, o lateral a un grupo conector L, respectivamente. Para facilitar la síntesis, la variable Z en R<sup>3</sup> es preferentemente C(O) (carbonilo), como se muestra.

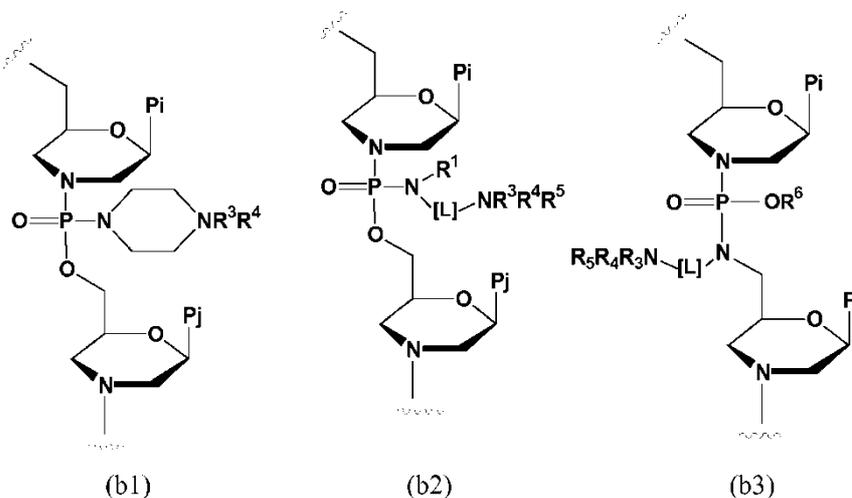
5 El grupo conector L, como se observa anteriormente, contiene enlaces en su esqueleto seleccionados de alquilo (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), alcoxi (-C-O-) y alquilamino (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-NH-), con la condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, los adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono. Aunque son posibles enlaces ramificados (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-CHCH<sub>3</sub>-), el conector está preferentemente sin ramificar. En una realización, el conector es un conector de hidrocarburo. Dicho conector puede tener la estructura -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, donde n es 1-12, preferentemente 2-8, y más preferentemente 2-6.

Las unidades de morfolino tienen la estructura:



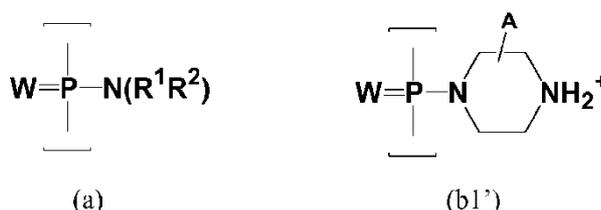
15 donde Pi es un resto de apareamiento de bases, y los enlaces representados anteriormente conectan el átomo de nitrógeno de (i) con el carbono 5' de una unidad adyacente. Los restos de apareamiento de bases Pi pueden ser iguales o diferentes, y, en general, se diseñan para proporcionar una secuencia que se une a un ácido nucleico diana.

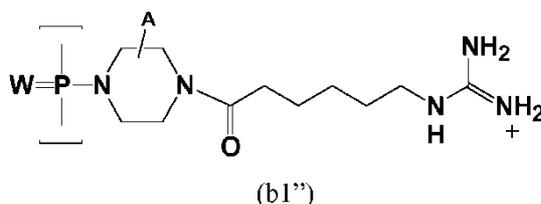
20 El uso de realizaciones de los tipos de enlace (b1), (b2) y (b3) anteriores para unir subunidades de morfolino se puede ilustrar gráficamente del siguiente modo:



25 Preferentemente, todos los enlaces catiónicos en el oligómero son del mismo tipo; es decir, todos de tipo (b1), todos de tipo (b2), o todos de tipo (b3).

30 En realizaciones adicionales, los enlaces catiónicos se seleccionan de enlaces (b1') y (b1'') como se muestra a continuación, donde (b1'') se denomina en el presente documento un enlace "Pip" y (b1') se denomina en el presente documento un enlace "GuX":





En las estructuras anteriores, W es S u O, y preferentemente es O; cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior, y preferentemente es metilo; y A representa hidrógeno o un sustituyente no interferente en uno o más átomos de carbono en (b1') y (b1''). Preferentemente, los carbonos del anillo en el anillo de piperazina están sin sustituir; sin embargo, pueden incluir sustituyentes no interferentes, tales como metilo o flúor. Preferentemente, como máximo uno o dos átomos de carbono está así sustituido. En realizaciones adicionales, al menos 10 % de los enlaces son de tipo (b1') o (b1''); por ejemplo, 10 %-60 % y preferentemente 20 % a 50 %, de los enlaces pueden ser de tipo (b1') o (b1'').

En ciertas realizaciones, el oligómero no contiene enlaces del tipo (b1') anterior. Alternativamente, el oligómero no contiene enlaces de tipo (b1) donde cada R es H, R<sup>3</sup> es H o CH<sub>3</sub>, y R<sup>4</sup> es H, CH<sub>3</sub>, o un par de electrones.

Las unidades de morfolino también pueden estar unidas por enlaces de intersubunidad no basados en fósforo, como se describen más adelante, donde al menos un enlace se modifica con un grupo catiónico lateral como se ha descrito anteriormente.

Se podrían usar otros enlaces de análogos de oligonucleótidos que no están cargados en su estado no modificado, pero que también podrían poseer un sustituyente de amina lateral. Por ejemplo, se podría emplear un átomo de 5'-nitrógeno en un anillo de morfolino en un enlace sulfamida o un enlace urea (donde el fósforo se sustituye por carbono o azufre, respectivamente) y se modifica de un modo análogo al átomo de 5'-nitrógeno en la estructura (b3) anterior.

Se proporcionan oligómeros que tienen cualquier número de enlaces catiónicos, que incluyen oligómeros unidos de forma completamente catiónica. Preferentemente, sin embargo, los oligómeros están parcialmente cargados, que tienen, por ejemplo, 10 %-80 %. En realizaciones preferidas, aproximadamente 10 % a 60 %, y preferentemente 20 % a 50 % de los enlaces son catiónicos.

En una realización, los enlaces catiónicos se intercalan a lo largo del esqueleto. Los oligómeros parcialmente cargados contienen preferentemente al menos dos enlaces consecutivos no cargados; es decir, el oligómero no tiene preferentemente un patrón estrictamente alterno a lo largo de su longitud entera.

También se consideran oligómeros que tienen bloques de enlaces catiónicos y bloques de enlaces no cargados; por ejemplo, se puede flanquear un bloque central de enlaces no cargados por bloques de enlaces catiónicos, o viceversa. En una realización, el oligómero tiene regiones 5', 3' y de centro de longitud aproximadamente igual, y el porcentaje de enlaces catiónicos en la región de centro es mayor que aproximadamente 50 %, preferentemente superior a aproximadamente 70 %.

Los oligómeros para su uso en aplicaciones antisentido varían, en general, en la longitud desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 40 subunidades, más preferentemente aproximadamente 10 a 30 subunidades, y normalmente 15-25 bases. Por ejemplo, un oligómero de la invención que tiene 19-20 subunidades, una longitud útil para un compuesto antisentido, puede tener idealmente dos a diez, por ejemplo, cuatro a ocho, enlaces catiónicos, y los restantes enlaces no cargados. Un oligómero que tiene 14-15 subunidades puede tener idealmente dos a siete, por ejemplo, 3, 4 o 5, enlaces catiónicos y el resto enlaces no cargados.

Cada estructura de anillo morfolino soporta un resto de apareamiento de bases, para formar una secuencia de restos de apareamiento de bases que normalmente se diseña para hibridarse con una diana antisentido seleccionada en una célula o en un sujeto que está tratándose. El resto de apareamiento de bases puede ser una purina o pirimidina encontrada en ADN o ARN nativo (por ejemplo, A, G, C, T o U) o un análogo, tal como hipoxantina (el componente de base del nucleósido inosina) o 5-metil-citosina.

#### TRANSPORTADORES DE PÉPTIDO

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido de la invención pueden incluir un resto de oligonucleótido conjugado con un resto de transporte de péptido rico en arginina eficaz para potenciar el transporte del compuesto en células. El resto de transporte se puede unir a un extremo del oligómero, como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1C. El resto de transporte de péptido comprende preferentemente 6 a 16 subunidades seleccionadas de subunidades X', subunidades Y' y subunidades Z', donde

(a) cada subunidad X' representa independientemente lisina, arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un  $\alpha$ -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de la estructura  $R^1N=C(NH_2)R^2$ , donde  $R^1$  es H o R;  $R^2$  es R,  $NH_2$ ,  $NHR$  o  $NR_2$ , donde R es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno;  $R^1$  y  $R^2$  pueden formar juntos un anillo; y la cadena lateral se une a dicho aminoácido por  $R^1$  o  $R^2$ ;

(b) cada subunidad Y' representa independientemente un aminoácido neutro  $-C(O)-(CHR)_n-NH-$ , donde n es 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo; y

(c) cada subunidad Z' representa independientemente un  $\alpha$ -aminoácido que tiene una cadena lateral de aralquilo neutro;

en donde el péptido comprende una secuencia representada por uno de  $(X'Y'X')_p$ ,  $(X'Y')_m$ , y  $(X'Z'Z')_p$ , donde p es 2 a 5 y m es 2 a 8. Ciertas realizaciones incluyen diversas combinaciones seleccionadas independientemente de  $(X'Y'X')_p$ ,  $(X'Y')_m$  y/o  $(X'Z'Z')_p$ , que incluyen, por ejemplo, péptidos que tienen la secuencia  $(X'Y'X')(X'Z'Z')(X'Y'X')(X'Z'Z')$  (SEQ ID NO:33).

En realizaciones seleccionadas, para cada X', el resto de cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácido arginina (Arg). En realizaciones adicionales, cada Y' es  $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$ , donde n es 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, abreviada en el presente documento Ahx; cuando n es 2 y R es H, Y' es una unidad de  $\beta$ -alanina, abreviada en el presente documento B. Ciertas realizaciones se refieren a péptidos portadores que tienen una combinación de diferentes aminoácidos neutros, que incluyen, por ejemplo, péptidos que comprenden la secuencia  $-RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB-$  (SEQ ID NO: 23), que contiene tanto  $\beta$ -alanina como ácido 6-aminohexanoico.

Los péptidos preferidos de este tipo incluyen los que comprenden dímeros de arginina que alternan con subunidades Y' individuales, donde Y' es preferentemente Ahx o glicina. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula  $(RY'R)_p$  o la fórmula  $(RRY')_p$ , donde Y' es preferentemente Ahx. En una realización, Y' es una unidad de ácido 6-aminohexanoico, R es arginina y p es 4.

Ciertas realizaciones incluyen diversas combinaciones lineales de al menos dos de  $(RY'R)_p$  y  $(RRY')_p$ , que incluyen, por ejemplo, péptidos ilustrativos que tienen la secuencia  $(RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY')$  (SEQ ID NO:34), o  $(RRY')(RY'R)(RRY')$  (SEQ ID NO:35). Se contemplan otras combinaciones. En una realización ilustrativa adicional, cada Z' es fenilalanina, y m es 3 o 4.

Los péptidos de administración a modo de ejemplo también incluyen poliarginina ( $R_n$ ) donde n puede variar desde 6 hasta 9 (véase SEQ ID NOs: 16, 24-26). Los péptidos adicionales incluyen el péptido Tat o Tat inverso (rTat) como se muestra más adelante en la Tabla 2 (véase SEQ ID NOs: 15, 29 y 30).

El péptido conjugado se une preferentemente a un extremo del oligómero por un conector Ahx-B, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de  $\beta$ -alanina, como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1C. Otro conector a modo de ejemplo es glicina.

En realizaciones seleccionadas, para cada X', el resto de cadena lateral se selecciona independientemente del grupo que consiste en guanidilo ( $HN=C(NH_2)NH-$ ), amidinilo ( $HN=C(NH_2)C<$ ), 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo, y se selecciona preferentemente de guanidilo y amidinilo. En una realización, el resto de cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácido arginina (Arg).

En ciertas realizaciones, las subunidades Y' pueden ser o contiguas, en las que ninguna subunidad X' se interpone entre las subunidades Y', o se intercalan individualmente entre subunidades X'. En ciertas realizaciones, la subunidad de enlace puede estar entre subunidades Y'. En una realización, las subunidades Y' están en un extremo del transportador; en otras realizaciones, están flanqueados por subunidades X'. En realizaciones preferidas adicionales, cada Y' es  $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$ , donde n es 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, abreviada Ahx en el presente documento.

En realizaciones seleccionadas de este grupo, cada X' comprende un resto de cadena lateral de guanidilo, como en una subunidad de arginina. Los péptidos preferidos de este tipo incluyen los que comprenden dímeros de arginina que alternan con subunidades Y' individuales, donde Y' es preferentemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula  $(RY'R)_4$  o la fórmula  $(RRY')_4$ , donde Y' es preferentemente Ahx. En el último caso, el análogo de ácido nucleico se une preferentemente a una subunidad Y' terminal, preferentemente en el extremo C, como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1C. El conector preferido es de la estructura AhxB o glicina, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de  $\beta$ -alanina.

Se ha mostrado que los restos de transporte como se describen en el presente documento potencian enormemente la entrada en la célula de oligómeros unidos, con respecto a la captación del oligómero en ausencia del resto de transporte unido, y con respecto a la captación por un resto de transporte unido que carece de las subunidades hidrófobas Y'. Dicha captación potenciada se evidencia preferentemente por al menos un incremento doble, y

preferentemente un incremento cuádruple, en la captación del compuesto en células de mamífero con respecto a la captación del agente por un resto de transporte unido que carece de las subunidades hidrófobas Y'. La captación se potencia preferentemente al menos veinte veces, y más preferentemente cuarenta veces, con respecto al compuesto no conjugado.

Un beneficio adicional del resto de transporte es su esperada capacidad para estabilizar un dúplex entre un compuesto antisentido y su secuencia de ácidos nucleicos diana, supuestamente en virtud de la interacción electrostática entre el resto de transporte positivamente cargado y el ácido nucleico negativamente cargado. El número de subunidades cargadas en el transportador es inferior a 14, como se observa anteriormente, y preferentemente entre 8 y 11.

El uso de transportadores de péptido rico en arginina (es decir, péptidos que penetran en las células) es particularmente útil en la práctica de ciertas realizaciones de la presente invención. Se ha mostrado que ciertos transportadores de péptido son altamente eficaces en la administración de compuestos antisentido en células primarias que incluyen células hematopoyéticas y de músculo (Marshall, Oda et al. 2007; Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008). Además, en comparación con otros transportadores de péptido conocidos, tales como penetratina y el péptido Tat, los transportadores de péptido descritos en el presente documento, cuando se conjugan con un PMO antisentido, demuestran una capacidad potenciada para alterar el corte y empalme de varios transcritos de genes (Marshall, Oda et al. 2007). Los transportadores de péptido a modo de ejemplo, que incluyen los conectores (B o AhxB), se muestran en la Tabla 2 a continuación (restos X se refieren a ácido 6-aminohexanoico).

Tabla 2. Transportadores de péptido a modo de ejemplo

<u>Péptido</u>	<u>Secuencia (extremo N a extremo C)</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
rTat	RRRQRRKKRC	15
R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>	RRRRRRRRFFC	16
(RAhx) <sub>4</sub> B	RAhxRAhxRAhxRAhxB	17
(RAhxR) <sub>4</sub> AhxB; (P007)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	18
(AhxRR) <sub>4</sub> AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	19
(RAhx) <sub>6</sub> B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	20
(RAhx) <sub>8</sub> B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	21
(RAhxR) <sub>5</sub> AhxB (CP04057)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	22
(RAhxRRBR) <sub>2</sub> AhxB; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	23
R <sub>6</sub> G	RRRRRRG	24
R <sub>7</sub> G	RRRRRRRG	25
R <sub>8</sub> G	RRRRRRRRG	26
R <sub>5</sub> GR <sub>4</sub> G	RRRRRGRRRRG	27
R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub> G	RRRRRFFRRRG	28
Tat-G	RKKRRQRRRG	29
rTat-G	RRRQRRKKRG	30
(RXR <sub>2</sub> G <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	RXRRGGRXRGG	31
(RXR <sub>3</sub> X) <sub>2</sub> G	RXRRRXRXXRXG	32

25 AGENTES DE INTERFERENCIA DE ARN

Las regiones diana del gen de señalización IL-17 descritas en el presente documento también pueden ser elegidas mediante una variedad de métodos basados en interferencia por ARN. La interferencia por ARN (iARN) es un mecanismo de silenciamiento génico evolutivamente conservado, descubierto originalmente en estudios del nematodo *Caenorhabditis elegans* (Lee et al, Cell 75:843,1993; Reinhart et al., Nature 403:901,2000). Se puede desencadenar introduciendo ARNbc en células que expresan la maquinaria molecular apropiada, que luego degrada el ARNm endógeno correspondiente. El mecanismo implica la conversión de ARNbc en ARN cortos que dirigen ribonucleasas a dianas de ARNm homólogas (resumido, Ruvkun, Science 2294:797, 2001).

En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento pueden utilizar moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) como agentes moduladores de genes de señalización IL-17. Los ARNbc comprenden, en general, dos cadenas individuales. Una cadena del ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una porción del gen diana o región diana (la cadena "sentido") y la otra cadena (la cadena "complementaria" o "antisentido") comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de la región diana. Las cadenas son suficientemente complementarias para hibridarse

para formar una estructura de dúplex. En ciertas realizaciones, la cadena de ARN complementaria puede ser inferior a 30 nucleótidos, inferior a 25 nucleótidos de longitud, o incluso de 19 a 24 nucleótidos de longitud. En ciertos aspectos, la secuencia de nucleótidos complementaria puede tener 20-23 nucleótidos de longitud, o 22 nucleótidos de longitud.

5 En ciertas realizaciones, al menos una de las cadenas de ARN comprende un nucleótido protuberante de 1 a 4 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el ARNbc puede comprender además al menos un nucleótido químicamente modificado. En ciertos aspectos, un ARNbc que comprende un nucleótido protuberante monocatenario de 1 a 4 nucleótidos puede comprender una molécula en donde el nucleótido sin aparear del  
10 nucleótido protuberante que es directamente adyacente al par de nucleótidos terminal contiene una base de purina. En otros aspectos, los últimos pares de nucleótidos complementarios en ambos extremos de un ARNbc son un par G-C o, al menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos terminales son pares G-C.

15 Ciertas realizaciones de la presente invención pueden comprender microARN. Los microARN representan un gran grupo de ARN pequeños producidos naturalmente en organismos, algunos de los cuales regulan la expresión de genes diana. Los microARN se forman a partir de un transcrito de precursor de horquilla monocatenaria de aproximadamente 70 nucleótidos por Dicer. (V. Ambros et al. *Current Biology* 13:807, 2003). Los microARN no se traducen en proteínas, sino que en su lugar se unen a ARN mensajeros específicos, bloqueando así la traducción. Se cree que los microARN emparejan bases imprecisamente con sus dianas para inhibir la traducción. Se pueden  
20 transcribir ciertos microARN como precursores de ARN de horquilla, que entonces se procesan en sus formas maduras por la enzima Dicer.

25 En ciertas realizaciones, el agente de modulación, u oligonucleótido de iARN, es monocatenario. En otras realizaciones, el agente de modulación, u oligonucleótido de iARN, es bicatenario. Ciertas realizaciones también pueden emplear ARN interferentes cortos (ARNip). En ciertas realizaciones, la primera cadena del oligonucleótido bicatenario contiene dos más restos de nucleósido que la segunda cadena. En otras realizaciones, la primera cadena y la segunda cadena tienen el mismo número de nucleósidos; sin embargo, la primera y segunda cadenas están desplazadas de forma que los dos nucleósidos terminales en la primera y segunda cadenas no se emparejan con un resto en la cadena complementaria. En ciertos casos, los dos nucleósidos que no se emparejan son restos  
30 timidina.

35 En casos cuando el agente de modulación comprende ARNip, el agente debe incluir una región de homología suficiente con la región diana, y ser de longitud suficiente en términos de nucleótidos, de forma que el agente de ARNip, o un fragmento del mismo, pueda mediar en la regulación por disminución del ARN diana. Se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también se puede referir, en el caso de un ARN modificado o sustituto de nucleótido, a un nucleótido modificado, o resto de sustitución sustituto en una o más posiciones. Así, un agente de ARNip es o incluye una región que es al menos parcialmente complementaria al ARN diana. No es necesario que haya complementariedad perfecta entre el agente de ARNip y la diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el agente de ARNip, o un producto de escisión del mismo, dirija el silenciamiento específico de  
40 secuencia, tal como por escisión de iARN del ARN diana. La complementariedad, o grado de homología con la cadena diana, es más crítica en la cadena no codificante. Mientras que se desea frecuentemente complementariedad perfecta, particularmente en la cadena no codificante, algunas realizaciones incluyen uno o más pero preferentemente 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, o menos desapareamientos con respecto al ARN diana. Los desapareamientos son los más tolerados en las regiones terminales, y si están presentes, preferentemente están en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. La cadena codificante solo necesita ser suficientemente complementaria con la cadena no codificante para mantener el carácter  
45 bicatenario global de la molécula.

50 Además, se puede modificar un agente de modulación de ARNip o incluir sustitutos de nucleósido. Se pueden modificar regiones monocatenarias de un agente de ARNip o incluir sustitutos de nucleósido, por ejemplo, la región o regiones no emparejadas de una estructura de horquilla, por ejemplo, una región que une dos regiones complementarias, puede tener modificaciones o sustitutos de nucleósido. También es útil la modificación para estabilizar uno o más extremos 3' o 5' de un agente de ARNip, por ejemplo, frente a exonucleasas, o para favorecer el agente de ARNip antisentido para entrar en RISC. Las modificaciones pueden incluir conectores de amino C3 (o C6, C7, C12), conectores de tiol, conectores carboxilo, espaciadores no nucleotídicos (C3, C6, C9, C12, abásicos, trietilenglicol, hexaetilenglicol), biotina especial o reactivos de fluoresceína que vienen como fosforamiditos y que tienen otro grupo hidroxilo protegido con DMT, que permite múltiples acoplamientos durante la síntesis de ARN.

60 Los agentes de ARNip pueden incluir, por ejemplo, moléculas que son lo suficientemente largas como para desencadenar la respuesta del interferón respuesta (que se puede escindir por Dicer (Bernstein et al. 2001. *Nature*, 409:363-366) y entrar en un RISC (complejo de silenciamiento inducido por iARN)), además de moléculas que son suficientemente cortas que no provocan la respuesta del interferón (moléculas que también se pueden escindir por Dicer y/o entran en un RISC), por ejemplo, moléculas que son de un tamaño que permite la entrada en un RISC, por ejemplo, moléculas que se parecen a los productos de escisión de Dicer. Las moléculas que son lo suficientemente  
65 cortas que no provocan una respuesta de interferón se llaman agentes de ARNip o agentes de iARN más cortos en el presente documento. "Agente de ARNip o agente de iARN más corto" como se usa se refiere a un agente de

ARNip que es suficientemente corto que no induce una respuesta de interferón perjudicial en una célula humana, por ejemplo, tiene una región de dúplex de menos de 60, pero preferentemente menos de 50, 40 o 30 pares de nucleótido. Un agente de modulación de ARNip, o un producto de escisión del mismo, puede regular por disminución un gen diana, por ejemplo, induciendo la iARN con respecto a un ARN diana.

Cada cadena de un agente de modulación de ARNip puede ser igual a o inferior a 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 nucleótidos de longitud. La cadena tiene preferentemente al menos 19 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena puede tener entre 21 y 25 nucleótidos de longitud. Los agentes de ARNip preferidos tienen una región de dúplex de 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos, y uno o más nucleótidos protuberantes, preferentemente uno o dos nucleótidos protuberantes en 3', de 2-3 nucleótidos.

Además de la homología con el ARN diana y la capacidad de regular por disminución un gen diana, un agente de modulación de ARNip puede tener una o más de las siguientes propiedades: puede, a pesar de las modificaciones, incluso en un número muy grande, o en todos los nucleósidos, tener una cadena no codificante que puede presentar bases (o bases modificadas) en la región estructural tridimensional apropiada de manera que sea capaz de formar apareamiento de bases correcto y formar una estructura de dúplex con un ARN diana homólogo que es suficiente para permitir la regulación por disminución de la diana, por ejemplo, por escisión del ARN diana; puede, a pesar de las modificaciones, incluso en un número muy grande, o en todos los nucleósidos, incluso tener propiedades de "tipo ARN", es decir, puede poseer las propiedades estructurales, químicas y físicas globales de una molécula de ARN, aún cuando no exclusivamente, o incluso parcialmente, de contenido basado en ribonucleótido. Por ejemplo, un agente de ARNip puede contener, por ejemplo, una cadena codificante y/o una no codificante en la que todos los azúcares del nucleótido contienen, por ejemplo, 2'-flúor en lugar de 2'-hidroxilo. Todavía cabe esperar que este agente que contiene desoxirribonucleótido presente propiedades de tipo ARN. Aunque no se desea quedar ligado a teoría, el flúor electronegativo prefiere una orientación axial cuando se une a la posición C2' de ribosa. Esta preferencia espacial de flúor puede forzar, a su vez, a los azúcares a adoptar un pliegue C3'-endo. Este es el mismo modo de plegamiento que el observado en moléculas de ARN y da lugar a la hélice de tipo familia de la característica A de ARN. Además, puesto que el flúor es un buen aceptor de enlaces hidrógeno, puede participar en las mismas interacciones de enlace de hidrógeno con moléculas de agua que son conocidas por estabilizar las estructuras de ARN. En general, se prefiere que un resto modificado en la posición del azúcar 2' sea capaz de entrar en el enlace de H que es más característico del resto OH de un ribonucleótido que el resto H de un desoxirribonucleótido.

Un "agente de iARN monocatenario", como se usa en el presente documento, es un agente de iARN que está constituido por una única molécula. Puede incluir una región de dúplex, formada por emparejamiento intracatenario, por ejemplo, puede ser, o incluir, una horquilla o estructura de mango de sartén. Los agentes de modulación de iARN monocatenario son preferentemente antisentido con respecto a la molécula diana. Un agente de iARN monocatenario debe ser suficientemente largo de manera que pueda entrar en el RISC y participar en la escisión mediada por RISC de un ARNm diana. Un agente de iARN monocatenario tiene al menos 14, y más preferentemente al menos 15, 20, 25, 29, 35, 40 o 50 nucleótidos de longitud. Es preferentemente inferior a 200, 100 o 60 nucleótidos de longitud.

Los agentes de modulación de iARN de horquilla pueden tener una región de dúplex igual a o de al menos 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos. La región de dúplex puede ser preferentemente igual a o inferior a 200, 100 o 50 de longitud. Ciertos intervalos para la región de dúplex son 15-30, 17 a 23, 19 a 23 y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud. La horquilla puede tener un nucleótido protuberante monocatenario o región no apareada terminal, preferentemente la 3', y preferentemente del lado antisentido de la horquilla. En ciertas realizaciones, los nucleótidos protuberantes tienen 2-3 nucleótidos de longitud.

Ciertos agentes de modulación utilizados según los métodos proporcionados en el presente documento pueden comprender oligonucleótidos de iARN, tales como oligonucleótidos quiméricos, o "quimeras", que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región en donde el oligonucleótido se modifica para conferir al oligonucleótido elevada resistencia a la degradación por nucleasas, elevada captación celular y/o elevada afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Por consiguiente, se pueden obtener frecuentemente resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con oligodesoxinucleótidos de fosforitoato. Se pueden formar oligonucleótidos quiméricos como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleótidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente. Dichos oligonucleótidos también se han denominado híbridos o gámperos en la técnica. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. N° 5,013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; 5.700.922; y 5.955.589. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido quimérico es ARN-ADN, ADN-ARN, ARN-ADN-ARN, ADN-ARN-ADN o ARN-ADN-ARN-ADN, en donde el oligonucleótido tiene entre 5 y 60 nucleótidos de longitud.

En un aspecto de la invención, agentes de modulación, tales como agentes de iARN, se refiere a un oligonucleótido

que comprende al menos un ligando conectado a una nucleobase alterada o no natural. Un gran número de compuestos pueden servir de base alterada. La estructura de la base alterada es importante hasta el punto que la base alterada no debe prevenir sustancialmente la unión del oligonucleótido a su diana, por ejemplo, ARNm. En ciertas realizaciones, la base alterada es difluorotolilo, nitropirrolilo, nitroimidazolilo, nitroindolilo, naftalenilo, antrancenilo, piridinilo, quinolinilo, pirenilo, o el radical divalente de una cualquiera de las nucleobases no naturales descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, la nucleobase no natural es difluorotolilo, nitropirrolilo o nitroimidazolilo. En ciertas realizaciones, la nucleobase no natural es difluorotolilo. Se conocen en la técnica una amplia variedad de ligandos y son susceptibles a la presente invención. Por ejemplo, el ligando puede ser un esteroide, ácido biliar, lípido, ácido fólico, piridoxal, B12, riboflavina, biotina, compuesto aromático, compuesto policíclico, éter corona, intercalador, molécula de escisión, aglutinante de proteínas, o hidrato de carbono. En ciertas realizaciones, el ligando es un esteroide o compuesto aromático. En ciertos casos, el ligando es colesterilo.

En otras realizaciones, el agente de iARN es un oligonucleótido conectado a un ligando a efectos de mejorar el direccionamiento y la captación celular. Por ejemplo, se puede conectar un agente de iARN a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo. Como ejemplo adicional, un agente de iARN se pueden conectar a una molécula de unión a ligando específica, tal como un polipéptido o fragmento de polipéptido que se une específicamente a un receptor de la superficie celular.

En otras realizaciones, el agente de modulación comprende una nucleobase no natural. En ciertas realizaciones, la nucleobase no natural es difluorotolilo, nitroimidazolilo, nitroindolilo o nitropirrolilo. En ciertas realizaciones, los agentes de modulación proporcionados en el presente documento se refieren a una secuencia de oligonucleótidos bicatenaria, en donde solo una de las dos cadenas contiene una nucleobase no natural. En ciertas realizaciones, agentes de modulación como se usa en el presente documento se refieren a una secuencia de oligonucleótidos bicatenaria, en donde ambas cadenas comprenden independientemente al menos una nucleobase no natural.

En ciertos casos, el resto de azúcar ribosa que ocurre naturalmente en los nucleósidos se sustituye por un azúcar hexosa. En ciertos aspectos, el azúcar hexosa es una alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, o un derivado de las mismas. En una realización preferida, la hexosa es una D-hexosa. En ciertos casos, el resto de azúcar ribosa que ocurre naturalmente en nucleósidos se sustituye por un anillo de heteroalquilo policíclico o grupo ciclohexenilo. En ciertos casos, el grupo heteroalquilo policíclico es un anillo bicíclico que contiene un átomo de oxígeno en el anillo. En ciertos casos, el grupo heteroalquilo policíclico es un biciclo[2.2.1]heptano, un biciclo[3.2.1]octano o un biciclo[3.3.1]nonano. En ciertas realizaciones, el esqueleto del oligonucleótido se ha modificado para mejorar las propiedades terapéuticas o de diagnóstico del compuesto de oligonucleótido. En ciertas realizaciones, al menos una de las bases o al menos uno de los azúcares del oligonucleótido se ha modificado para mejorar las propiedades terapéuticas o de diagnóstico del compuesto de oligonucleótido. En casos cuando el oligonucleótido es bicatenario, las dos cadenas son complementarias, parcialmente complementarias, o oligonucleótidos quiméricos.

Los ejemplos de agentes de iARN modificados previstos para su uso en los métodos de la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Como se define aquí, los oligonucleótidos que tienen esqueletos o enlaces internucleosídicos modificados incluyen los que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y los que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. También se puede considerar que son oligonucleótidos los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto interazúcar. Se describen más adelante modificaciones químicas específicas de los oligonucleótidos. No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado sean uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las siguientes modificaciones se puede incorporar en un compuesto de un solo oligonucleótido o incluso en un único nucleótido del mismo.

Los ejemplos de enlaces o esqueletos internucleosídicos modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que incluyen 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos en 2'-5' de estos, y los que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos se unen 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen átomos de fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. Nº 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; y 5.697.248.

Los ejemplos de enlaces o esqueletos internucleosídicos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en su interior (es decir, oligonucleótidos) tienen esqueletos que se forman por enlaces interazúcar de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces interazúcar mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces interazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte

de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formaceto y tioformaceto; esqueletos de metilenoformaceto y de tioformaceto; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenoimino y metilenoimidazolidino; esqueletos de sulfonato y de sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes mixtos de N, O, S y CH<sub>2</sub>.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleótidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. N.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439. En otros ejemplos de miméticos de oligonucleótidos, tanto el enlace de azúcar como el internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleósido, se puede sustituir con grupos novedosos. Las unidades de nucleobase se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Dicho oligonucleótido, un mimético de oligonucleótido, que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Se retienen las nucleobases y se unen directa o indirectamente a átomos de la porción de amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. N.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. La enseñanza adicional de compuestos de PNA se puede encontrar en Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497.

La presente invención engloba además oligonucleótidos que emplean ribozimas. Las moléculas de ARN sintéticas y sus derivados que catalizan actividades de endorribonucleasa altamente específicas se conocen como ribozimas (véase, en general, la patente de EE. UU. N.º 5.543.508 a Haseloff et al., y la patente de EE. UU. N.º 5.545.729 a Goodchild et al.). Las reacciones de escisión se catalizan por las propias moléculas de ARN. En moléculas de ARN que existen de forma natural, los sitios de escisión autocatalizada se localizan dentro de regiones altamente conservadas de estructura secundaria de ARN (Buzayan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, 83, 8859; Forster et al., *Cell*, 1987, 50, 9). Se han modificado las moléculas de ARN autocatalíticas que existen de forma natural para generar ribozimas que pueden ser dirigidas a una molécula de ARN celular o patógena particular con un alto grado de especificidad. Así, las ribozimas sirven al mismo uso general que los oligonucleótidos antisentido (es decir, modulación de la expresión de un gen específico) y, al igual que los oligonucleótidos, son ácidos nucleicos que poseen porciones significativas de naturaleza monocatenaria de las cadenas. Es decir, las ribozimas tienen una identidad química y funcional sustancial con oligonucleótidos y así se considera que son equivalentes para los fines de la presente invención.

En ciertos casos, los agentes de iARN para su uso con los métodos proporcionados en el presente documento se pueden modificar por grupo de no ligando. Se han conjugado varias moléculas de no ligando con oligonucleótidos para potenciar la actividad, distribución celular, direccionamiento o captación celular del oligonucleótido, y en la bibliografía científica están disponibles procedimientos para realizar dichas conjugaciones. Dichos restos de no ligando han incluido restos de lípido, tales como colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) o ácido adamantanoacético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), un resto palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), o una octadecilamina o resto de hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Se han enumerado anteriormente las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótido. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de oligonucleótidos que llevan un aminoconector en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar entonces con la molécula que se conjuga usando reactivos de acoplamiento o de activación apropiados. La reacción de conjugación se puede realizar o con el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido o después de la escisión del oligonucleótido en fase de disolución. La purificación del conjugado de oligonucleótido por HPLC proporciona normalmente el conjugado puro.

Los ejemplos adicionales de agentes de modulación, tales como oligonucleótidos de iARN, se pueden encontrar en las publicaciones de solicitud de EE. UU. N.º 2007/0275465, 2007/0054279, 2006/0287260, 2006/0035254, 2006/0008822.

#### MÉTODOS DE USO

En otro aspecto, la presente invención se refiere a agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 descrito en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una célula, tejido o sujeto, normalmente para modular la actividad de un componente de señalización de IL-17 en un modo terapéuticamente

beneficioso. Las células o tejido que se pueden modular por la presente invención son preferentemente células de mamífero, o más preferentemente células humanas. Dichas células pueden ser de un estado sano o de un estado enfermo.

5 En ciertas realizaciones, por ejemplo, se proporcionan métodos para modular terapéuticamente actividades celulares relevantes que incluyen, pero no se limitan a, metabolismo celular, diferenciación celular, proliferación celular, muerte celular, movilización celular, migración celular, función del sistema inmunitario (por ejemplo, inflamación, autoinmunidad), transcripción génica, traducción de ARNm, impedancia celular, producción de citocinas y similares, que comprenden poner en contacto una célula con un agente antisentido o de iARN dirigido contra el gen de  
10 señalización IL-17 como se describe en el presente documento.

Ciertas realizaciones preferidas se refieren a los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 descritos en el presente documento para su uso en la modulación de enfermedad asociada al virus de la fiebre hemorrágica (VFH). Los ejemplos de dichos virus incluyen los de las familias virales Arenaviridae, Flaviviridae,  
15 Filoviridae, Togaviridae, Arteriviridae y Bunyaviridae. Los ejemplos específicos de Arenaviridae incluyen virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus de Machupo, virus de Lassa, virus de Pichinde, virus de Tacaribe y virus de Lugo. Los ejemplos específicos de Flaviviridae incluyen virus del dengue, virus del Nilo occidental y virus de la fiebre amarilla. Los ejemplos específicos de Filoviridae incluyen virus del Ébola y virus de Marburgo. Los ejemplos específicos de Togaviridae incluyen virus Chikungunya, y los ejemplos específicos de Arteriviridae incluyen VFH simio. Los ejemplos específicos de Bunyaviridae incluyen virus de Crimea-Congo (por ejemplo, virus de la fiebre hemorrágica del Congo), Hantavirus y virus del valle del Rift. Se incluyen métodos de tratamiento de dichas infecciones virales, y métodos de reducción de la inflamación asociada a las mismas.

Ciertas realizaciones incluyen los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 descritos en el presente documento para su uso en los métodos de disminución de la inflamación, y dependiendo de las necesidades del sujeto y la selección de la secuencia diana. "Inflamación" se refiere, en general, a la respuesta biológica de los tejidos a los estímulos perjudiciales, tales como patógenos, células dañadas (por ejemplo, heridas) e irritantes. El término "respuesta inflamatoria" se refiere a los mecanismos específicos por los que se logra y regula la inflamación, que incluyen, simplemente a modo de ilustración, activación o migración celular inmunitaria, producción  
25 de citocinas, vasodilatación, que incluye liberación de quinina, fibrinólisis y coagulación, descritos, entre otros, en el presente documento y conocidos en la técnica. Idealmente, la inflamación es un intento protector por el cuerpo de tanto eliminar los estímulos perjudiciales como de iniciar el proceso de curación del tejido o los tejidos afectados. En ausencia de inflamación, las heridas e infecciones nunca se curarían, creando una situación en la que la destrucción progresiva del tejido amenazaría la supervivencia. Por otra parte, la excesiva inflamación o inflamación crónica se puede asociar con una variedad de enfermedades, tales como fiebre del heno, aterosclerosis y artritis reumatoide,  
30 entre otras, descritas en el presente documento y conocidas en la técnica.

Los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 de la invención pueden modular la inflamación aguda, inflamación crónica, o ambas. Ciertas realizaciones se refieren a aumentar la inflamación aguda o las respuestas inflamatorias agudas, y ciertas realizaciones se refieren a aumentar la inflamación crónica o respuestas inflamatorias crónicas. Dependiendo de las necesidades del sujeto, ciertas realizaciones se refieren a reducir la inflamación aguda o las respuestas inflamatorias, y ciertas realizaciones se refieren a reducir la inflamación crónica o las respuestas inflamatorias crónicas.

45 Inflamación aguda se refiere a la respuesta inicial del cuerpo a estímulos supuestamente perjudiciales e implica el elevado movimiento del plasma y los leucocitos de la sangre en los tejidos lesionados. Es un proceso a corto plazo, que empieza normalmente en el plazo de minutos u horas y que termina después de la retirada del estímulo perjudicial. La inflamación aguda se puede caracterizar por uno cualquiera o más de rojez, elevado calor, hinchazón, dolor y pérdida de función. La rojez y el calor son principalmente debidos al aumento de la circulación sanguínea a la temperatura central del cuerpo en el sitio inflamado, la hinchazón se provoca por la acumulación de fluido, el dolor es normalmente debido a la liberación de productos químicos que estimulan las terminaciones nerviosas, y la pérdida de función tiene múltiples causas.

Las respuestas inflamatorias agudas se inician principalmente por células inmunitarias locales, tales como macrófagos residentes, células dendríticas, histiocitos, células de Kupffer y mastocitos. En la aparición de una infección, quemadura u otras lesiones, estas células se activan y liberan mediadores inflamatorios responsables de los signos clínicos de la inflamación, tales como aminas vasoactivas y eicosanoides. La vasodilatación y su elevado flujo sanguíneo resultante provocan la rojez y el elevado calor. La elevada permeabilidad de los vasos sanguíneos da como resultado una exudación o fuga de proteínas plasmática y líquido en el tejido, que crea hinchazón. Ciertos mediadores liberados, tales como bradiquinina, aumentan la sensibilidad al dolor, y alteran los vasos sanguíneos para permitir la migración o la extravasación de leucocitos, tales como neutrófilos, que normalmente migran a lo largo de un gradiente quimiotáctico creado por las células inmunitarias locales.

Las respuestas inflamatorias agudas también incluyen uno o más sistemas de cascadas bioquímicas acelulares, que consisten en proteínas plasmáticas modulan, que actúan en paralelo para iniciar y propagar la respuesta inflamatoria. Estos sistemas incluyen el sistema del complemento, que se activa principalmente por bacterias, y el

sistema de la coagulación y de la fibrinólisis, que se activan principalmente por necrosis, tales como el tipo de daño tisular que se provoca por ciertas infecciones, quemaduras u otro traumatismo. Por tanto, los agentes antisentido y de iARN se pueden usar para modular la inflamación aguda, o cualquiera de una o más de las respuestas inflamatorias agudas individuales.

5 La inflamación crónica, una respuesta inflamatoria prolongada y retrasada, se caracteriza por un desplazamiento progresivo en el tipo de células que están presentes en el sitio de inflamación, y frecuentemente conduce a la destrucción simultánea o casi simultánea y a la curación del tejido del proceso inflamatorio. A nivel celular, las respuestas inflamatorias crónicas implican una variedad de células inmunitarias tales como monocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos, aunque a diferencia de la inflamación aguda, que está mediada principalmente por granulocitos, la inflamación crónica está mediada principalmente por células mononucleares tales como monocitos y linfocitos. La inflamación crónica también implica una variedad de mediadores inflamatorios, tales como IFN- $\gamma$  y otras citocinas, factores de crecimiento, especies reactivas de oxígeno y enzimas hidrolíticas. La inflamación crónica puede durar muchos meses o años, y puede dar como resultado la destrucción no deseada de tejido y fibrosis.

20 Los signos clínicos de la inflamación crónica dependen de la duración de las enfermedades, lesiones inflamatorias, causa y área anatómica afectada (véase, por ejemplo, Kumar et al., Robbins Basic Pathology-8ª Ed., 2009 Elsevier, London; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canadá). La inflamación crónica está asociada con una variedad de afecciones o enfermedades patológicas, que incluyen, por ejemplo, alergias, enfermedad de Alzheimer, anemia, estenosis de la válvula aórtica, artritis tal como artritis reumatoide y osteoartritis, cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva, fibromialgia, fibrosis, infarto de miocardio, insuficiencia renal, lupus, pancreatitis, accidente cerebrovascular, complicaciones quirúrgicas, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad inflamatoria del intestino, aterosclerosis y psoriasis, entre otras descritas en el presente documento y conocidas en la técnica. Por tanto, los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 se pueden usar para tratar o gestionar la inflamación crónica, modular cualquiera de una o más de las respuestas inflamatorias crónicas individuales, o tratar una cualquiera o más enfermedades o afecciones asociadas a inflamación crónica.

30 Los agentes antisentido y de iARN también pueden modular la inflamación proliferativa, un proceso inflamatorio caracterizado por un aumento en el número de células de tejido. Estas pueden englobar afecciones de la piel tales como psoriasis, seborrea o eccema, o también se puede pensar en términos de cánceres y crecimientos anormales especialmente en vista de cada vez más pruebas basadas en métodos moleculares más eficientes para documentar incluso la inflamación crónica leve.

35 En ciertas realizaciones, los agentes antisentido y de iARN pueden modular respuestas inflamatorias a nivel celular, tal como modular la activación, secreción de moléculas inflamatorias (por ejemplo, secreción de citocinas o de quinina), proliferación, actividad, migración o adhesión de diversas células implicadas en la inflamación. Los ejemplos de dichas células incluyen células inmunitarias y células vasculares. Las células inmunitarias incluyen, por ejemplo, granulocitos tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos/monocitos, linfocitos tales como linfocitos B, linfocitos T citolíticos (es decir, linfocitos T CD8+), linfocitos T cooperadores (es decir, linfocitos T CD4+, que incluyen linfocitos T<sub>h1</sub> y T<sub>h2</sub>), linfocitos citolíticos espontáneos, linfocitos T  $\gamma\delta$ , células dendríticas y mastocitos. Los ejemplos de células vasculares incluyen células de músculo liso, células endoteliales y fibroblastos. También se incluyen métodos de modulación de una afección inflamatoria asociada a una o más células inmunitarias o células vasculares, que incluyen afecciones inflamatorias mediadas por neutrófilos, mediadas por macrófagos y mediadas por linfocitos.

50 En ciertas realizaciones, los agentes antisentido y de iARN pueden modular los niveles o la actividad de moléculas inflamatorias, que incluyen moléculas inflamatorias derivadas de plasma y moléculas inflamatorias derivadas de célula (por ejemplo, TNF-alfa, IL-1, IL-2, IL-5, moléculas de adhesión, Cox-2 y otros). Se incluyen moléculas pro-inflamatorias y moléculas antiinflamatorias. Los ejemplos de moléculas inflamatorias derivadas de plasma incluyen, sin limitación, proteínas o moléculas de uno cualquiera o más del sistema del complemento, sistema quinina, sistema de la coagulación y el sistema de la fibrinólisis. Los ejemplos de miembros del sistema del complemento incluyen C1, que existe en suero sanguíneo como un complejo molecular que contiene aproximadamente 6 moléculas de C1q, 2 moléculas de C1r y 2 moléculas de C1s, C2 (a y b), C3(a y B), C4 (a y b), C5, y el complejo de ataque de la membrana de C5a, C5b, C6, C7, C8 y C9. Los ejemplos del sistema quinina incluyen bradiquinina, calidina, calidreínas, carboxipeptidasas, enzima convertidora de la angiotensina y endopeptidasa neutra.

60 Los ejemplos de moléculas inflamatorias derivadas de célula incluyen, sin limitación, enzimas contenidas dentro de gránulos de lisosoma, aminas vasoactivas, eicosanoides, citocinas, proteínas de la fase aguda y gases solubles tales como óxido nítrico. Las aminas vasoactivas contienen al menos un grupo amino, y vasos sanguíneos diana para alterar su permeabilidad o provocar la vasodilatación. Los ejemplos de aminas vasoactivas incluyen histamina y serotonina. Los eicosanoides se refieren a la señalización moléculas producidas por la oxidación de ácidos grasos esenciales de veinte carbonos, e incluyen prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos.

65 Las citocinas se refieren a una variedad de sustancias que son secretadas por las células inmunitarias, e incluyen

polipéptidos y glucoproteínas. Normalmente, las citocinas se clasifican como citocinas autocrinas, que actúan sobre el mismo tipo de célula del que se secretada la citocina, o citocinas paracrinas, que se limitan a actuar sobre un tipo de célula diferente del que se secreta la citocina. Los ejemplos de citocinas que se pueden modular incluyen GM-CSF, IL-1a, IL1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN-gamma, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CXCL1-5, CXCL9-14 y CXCL16, entre otros conocidos en la técnica.

Cada citocina tiene normalmente un receptor de citocinas correspondiente. Los ejemplos de clases de receptores de citocinas incluyen, sin limitación, receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), tales como los tipos de receptor de IL-1, que comparten homología estructural con las inmunoglobulinas (anticuerpos), moléculas de adhesión a células, e incluso algunas citocinas, y receptores de la familia del factor de crecimiento hepatopoyético, tales como la familia de receptores de IL-2 y los receptores para GM-CSF, IL-3 e IL-5, receptores de la familia de interferón (tipo 2), que incluyen receptores para IFN  $\beta$  y  $\gamma$ . Los ejemplos adicionales incluyen receptores de la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) (tipo 3), que comparten un dominio de unión extracelular común rico en cisteína e interaccionan con varios otros ligando no de citocina, tales como CD40, CD27 y CD30, receptores de la familia de siete hélices transmembranarias, que incluyen receptores acoplados a la proteína G, y receptores de quimiocina tales como CXCR4 y CCR5, así como receptores para IL-8, MIP-1 y RANTES. Por tanto, en ciertas realizaciones, los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 pueden modular los niveles o la actividad de una o más citocinas seleccionadas, los niveles o la actividad de uno o más receptores de citocinas seleccionadas, la interacción entre citocinas y sus receptores, o cualquier combinación de los mismos.

Los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 también pueden modular los niveles o la actividad de proteínas de la fase aguda. Los ejemplos de proteínas de la fase aguda incluyen proteína C reactiva, amiloide A del suero, amiloide P del suero y vasopresina. En ciertos casos, la expresión de proteínas de la fase aguda puede provocar una variedad de efectos sistémicos no deseados que incluyen amiloidosis, fiebre, aumento de la tensión arterial, disminución de la sudoración, malestar general, pérdida del apetito y somnolencia. Por consiguiente, los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 pueden modular los niveles o la actividad de proteínas de la fase aguda, sus efectos sistémicos, o ambos.

En ciertas realizaciones, los agentes antisentido y de iARN pueden modular la inflamación local, inflamación sistémica, o ambos. En ciertas realizaciones, pueden reducir o mantener (es decir, prevenir aumentos adicionales) la inflamación local o respuestas inflamatorias locales. En ciertas realizaciones, dependiendo de las necesidades del sujeto, los agentes antisentido y de iARN pueden aumentar la inflamación local o las respuestas inflamatorias locales. En ciertas realizaciones, pueden reducir o mantener (es decir, prevenir aumentos adicionales) la inflamación sistémica o respuestas inflamatorias sistémicas. En ciertas realizaciones, dependiendo de las necesidades del sujeto, los agentes antisentido y de iARN pueden aumentar la inflamación sistémica o las respuestas inflamatorias sistémicas.

En ciertas realizaciones, la modulación de la inflamación o las respuestas inflamatorias se pueden asociar a uno o más tejidos u órganos. Los ejemplos no limitantes de dichos tejidos u órganos incluyen la piel (por ejemplo, dermis, epidermis, capa subcutánea), folículos pilosos, sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, médula espinal, nervios periféricos), sistema auditivo u órganos del equilibrio (por ejemplo, oído interno, oído medio, oído externo), aparato respiratorio (por ejemplo, nariz, tráquea, pulmones), tejidos gastroesofágico, el sistema gastrointestinal (por ejemplo, boca, esófago, estómago, intestinos delgados, intestinos gruesos, recto), sistema vascular (por ejemplo, corazón, vasos sanguíneos y arterias), hígado, vesícula biliar, sistema linfático/inmunitario (por ejemplo, ganglios linfáticos, folículos linfoides, bazo, timo, médula ósea), aparato genitourinario (por ejemplo, riñones, uréter, vejiga, uretra, cuello uterino, trompas de Falopio, ovarios, útero, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epidídimo, próstata, vesículas seminales, testículos), sistema musculoesquelético (por ejemplo, músculos esqueléticos, músculos lisos, hueso, cartílago, tendones, ligamentos), tejido adiposo, mamas y el sistema endocrino (por ejemplo, hipotálamo, pituitaria, tiroides, páncreas, glándulas suprarrenales). Por consiguiente, los agentes antisentido y de iARN se pueden usar para modular la inflamación asociada a cualquiera de estos tejidos u órganos, tal como para tratar afecciones o enfermedades que están asociadas con la inflamación de estos tejidos u órganos.

Como se observa anteriormente, ciertas realizaciones pueden emplear los agentes antisentido y de iARN descritos en el presente documento para reducir o gestionar (es decir, prevenir aumentos adicionales) la inflamación o las respuestas inflamatorias asociadas a tejidos u órganos particulares. Se incluyen respuestas inflamatorias y afecciones asociadas a la piel, que incluyen inflamación, infecciones y cánceres asociados a las capas dérmica, epidérmica y subcutánea de la piel. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas a la piel incluyen, sin limitación, dermatitis, tales como psoriasis, dermatitis irritante, dermatitis seborreica, dermatitis atópica (eccema), dermatitis alérgica de contacto, dermatitis inducida por calor, dermatitis inducida por fármacos, dermatitis dishidrótica, urticaria, dermatitis autoinmunitaria, cáncer de piel tal como melanoma y dermatitis bullosa. También se incluyen infecciones bacterianas, virales y parasíticas, eritema multiforme, eritema nodoso, granuloma anular, roble venenoso/hiedra venenosa y necrólisis epidérmica tóxica.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al sistema nervioso, que incluyen inflamación, infecciones y cáncer asociado al cerebro y médula espinal del sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico y las meninges. La expresión de mediadores inflamatorios que incluyen el

complemento, moléculas de adhesión, enzimas ciclooxygenasas y sus productos y citocinas es elevada en enfermedad neurodegenerativa experimental y clínica, y estudios de intervención en animales experimentales sugieren que varios de estos factores contribuyen directamente a la lesión neuronal. Por ejemplo, las citocinas específicas, tales como la interleucina-1 (IL-1), participan considerablemente en la neurodegeneración aguda, tal como el accidente cerebrovascular y la lesión de cabeza.

Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al sistema nervioso incluyen, sin limitación, meningitis (es decir, inflamación de las membranas protectoras que cubren el cerebro y la médula espinal), mielitis, encefalomielitis (por ejemplo, encefalomielitis miálgica, encefalomielitis aguda diseminada, encefalomielitis diseminada o esclerosis múltiple, encefalomielitis autoinmunitaria), aracnoiditis (es decir, inflamación de la aracnoides, una de las membranas que rodean y protegen los nervios del sistema nervioso central), granuloma, inflamación inducida por fármacos o meningitis, enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, demencia por VIH, encefalitis tal como encefalitis viral y encefalitis bacteriana, infecciones parasíticas, trastornos desmielinizantes inflamatorios y trastornos autoinmunitarios tales como enfermedades autoinmunitarias mediadas por linfocitos T CD8+ del SNC. Los ejemplos adicionales incluyen enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barré, neuropatía autoinmunitaria, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad neurológica paraneoplásica, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásica, atrofia cerebelosa progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydenham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmunitaria, neuropatía disimunitaria, neuromiotonia adquirida, artrogriposis múltiple, neuritis óptica y síndrome de la persona rígida.

Como se observa anteriormente, también se incluye inflamación asociada a infecciones del sistema nervioso. Los ejemplos específicos de infecciones bacterianas asociadas a inflamación del sistema nervioso incluyen, sin limitación, infección estreptocócica tal como estreptococos del grupo B (por ejemplo, subtipos III) y *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo, serotipos 6, 9, 14, 18 y 23), *Escherichia coli* (por ejemplo, que llevan el antígeno K1), *Listeria monocytogenes* (por ejemplo, serotipo IVb), infección por *Neisseria* tal como *Neisseria meningitidis* (meningococos), infección estafilocócica, infección por *Haemophilus* tal como *Haemophilus influenzae* de tipo B, *Klebsiella*, y *Mycobacterium tuberculosis*. También se incluyen infecciones por estafilococos y pseudomonas y otros bacilos Gram-negativos, principalmente con respecto al traumatismo al cráneo, que da a las bacterias en la fosa nasal la posibilidad de entrar en el espacio meníngeo, o en personas con derivación cerebral o dispositivo relacionado (por ejemplo, drenaje extraventricular, depósito de Ommaya). Los ejemplos específicos de infecciones virales asociadas a la inflamación del sistema nervioso incluyen, sin limitación, enterovirus, virus del herpes simple de tipo 1 y 2, virus linfotrópico T humano, virus de la varicela-zóster (varicela y zóster), virus de las paperas, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). La meningitis también puede resultar de infección por espiroquetas tales como *Treponema pallidum* (sífilis) y *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), parásitos tales como la malaria (por ejemplo, malaria cerebral), hongos tales como *Cryptococcus neoformans* y ameba tal como *Naegleria fowleri*.

La meningitis u otras formas de inflamación del sistema nervioso también se pueden asociar con la diseminación del cáncer a las meninges (meningitis maligna), ciertos fármacos tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos e inmunoglobulinas intravenosas, sarcoidosis (o neurosarcoidosis), trastornos del tejido conjuntivo tales como lupus eritematoso sistémico, y ciertas formas de vasculitis (afecciones inflamatorias de la pared de los vasos sanguíneos) tal como la enfermedad de Behçet. Los quistes epidermoides y los quistes dermoides pueden provocar meningitis por liberación de materia irritante en el espacio subaracnoideo. Por consiguiente, los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 se pueden usar para tratar o gestionar una cualquiera o más de estas afecciones.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al sistema auditivo u órganos del equilibrio, tales como el oído interno, el oído medio y el oído externo. Los ejemplos de afecciones inflamatorias del sistema auditivo o de los órganos del equilibrio asociados incluyen, sin limitación, la inflamación del oído externo (por ejemplo, infecciones de oído), inflamación del oído medio, que puede conducir a la acumulación de líquido en el espacio normalmente lleno de aire y sordera parcial conductora asociada, laberintitis, una infección o inflamación del oído interno que causa tanto mareos (vértigo) como sordera parcial, neuronitis vestibular, una infección del nervio vestibular, en general, viral, que causa vértigo y neuronitis coclear, una infección del nervio coclear, en general, viral, que causa sordera súbita, pero no vértigo. Los receptores de los implantes cocleares para la sordera parcial están en un alto riesgo de meningitis neumocócica y su inflamación asociada.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al aparato respiratorio, que incluyen inflamación, infecciones y cáncer asociado a la nariz, tráquea y pulmones. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al aparato respiratorio incluyen, sin limitación, asma atópica, asma no atópica, asma alérgica, asma bronquial atópica mediada por IgE, asma bronquial, asma esencial, asma verdadera, asma intrínseca provocada por alteraciones patofisiológicas, asma extrínseca provocada por factores ambientales, asma esencial de causas desconocidas o asintomáticas, asma no atópica, asma bronquítica, asma enfisematosa, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por alérgenos, asma inducida por aire frío, asma ocupacional, asma infecciosa provocada por infección bacteriana, fúngica, protozoica o viral, asma no alérgica, asma incipiente, síndrome del lactante sibilante y bronquiolitis, broncoconstricción crónica o aguda, bronquitis crónica, obstrucción de

las vías respiratorias pequeñas y enfisema. Los ejemplos adicionales incluyen enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias tales como neumonía eosinófila crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), EPOC que incluye bronquitis crónica, enfisema pulmonar o falta de aliento asociada o no asociada a EPOC, EPOC que se caracteriza por obstrucción progresiva irreversible de las vías respiratorias y síndrome disneico del adulto (SDE).

Los ejemplos adicionales de afecciones asociadas a inflamación pulmonar incluyen afecciones relacionadas con la exacerbación de la hiperreactividad de las vías respiratorias resultante de otra farmacoterapia, enfermedad de las vías respiratorias que está asociada con hipertensión pulmonar, bronquitis tales como bronquitis aguda, bronquitis laringotraqueal aguda, bronquitis araquídica, bronquitis catarral, bronquitis pseudomembranosa, bronquitis seca, bronquitis asmática infecciosa, bronquitis productiva, bronquitis estafilocócica o estreptocócica y bronquitis vesicular, lesión pulmonar aguda y bronquiectasia tal como bronquiectasia cilíndrica, bronquiectasia sacular, bronquiectasia fusiforme, bronquiectasia capilar, bronquiectasia quística, bronquiectasia seca y bronquiectasia folicular.

EPOC se refiere en particular a un grupo de enfermedades pulmonares que bloquean el flujo de aire y que dificulta cada vez más que los individuos afectados respiren normalmente. El enfisema y la bronquitis crónica son las dos afecciones principales dentro del grupo de las enfermedades de EPOC, pero la EPOC también se puede referir al daño provocado por la bronquitis asmática crónica, entre otras afecciones conocidas en la técnica. En la mayoría de los casos, el daño a las vías respiratorias interfiere con el tiempo con el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en los pulmones. Los tratamientos habituales se basan principalmente en controlar los síntomas y minimizar el daño posterior.

El enfisema representa un aspecto de la EPOC. El enfisema conduce a inflamación dentro de las frágiles paredes de los alvéolos, que puede destruir algunas de las paredes y fibras elásticas, que permite que pequeñas vías respiratorias colapsen tras la exhalación, y que altere el flujo de aire que sale de los pulmones. Los signos y síntomas del enfisema incluyen, por ejemplo, falta de aliento, especialmente durante actividades físicas, sibilancias y opresión torácica.

La bronquitis crónica representa otro aspecto de la EPOC. La bronquitis crónica se caracteriza por una tos en curso y conduce a inflamación y estrechamiento de los tubos bronquiales. Esta afección también provoca la elevada producción de moco, que puede bloquear además los tubos estrechados. La bronquitis crónica ocurre principalmente en fumadores, y normalmente se define como una tos que dura al menos tres meses al año durante dos años seguidos. Los signos y los síntomas de la bronquitis crónica incluyen, por ejemplo, tener que carraspear a primera hora de la mañana, especialmente para fumadores, una tos crónica que produce esputo amarillento, falta de aliento en las etapas posteriores e infecciones respiratorias frecuentes.

Como se observa anteriormente, la EPOC se refiere principalmente a la obstrucción en los pulmones resultante de las dos afecciones pulmonares crónicas anteriormente indicadas. Sin embargo, muchos individuos con EPOC tienen estas dos afecciones.

La bronquitis asmática crónica representa otro aspecto de la EPOC. La bronquitis asmática crónica se caracteriza normalmente como bronquitis crónica combinada con asma (broncoespasmo). El asma puede ocurrir cuando secreciones inflamadas e infectadas irritan los músculos lisos en las vías respiratorias. Los síntomas son similares a los de la bronquitis crónica, pero también incluyen episodios intermitentes, o incluso diarios, de sibilancias.

En ciertas realizaciones, la EPOC es causada por último lugar por fumar tabaco y otros irritantes. En la gran mayoría de los casos, el daño pulmonar que conduce a la EPOC se provoca por fumar tabaco a largo plazo. Sin embargo, otros irritantes pueden provocar EPOC, que incluye fumar puros, tabaquismo pasivo, fumar en pipa, contaminación del aire y ciertos humos laborales. La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), que ocurre cuando los ácidos del estómago regresan al esófago, no solo puede agravar la EPOC, sino incluso provocarla en algunos individuos. En casos raros, la EPOC resulta de un trastorno genético que provoca bajos niveles de una proteína denominada alfa-1-antitripsina. Por tanto, los factores de riesgo para la EPOC incluyen exposición al humo del tabaco, exposición laboral a polvos y productos químicos (la exposición a largo plazo a humos químicos, vapores y polvos irrita e inflama los pulmones), enfermedad por reflujo gastroesofágico (una forma intensa de reflujo de ácidos - el reflujo de ácido y otros contenidos del estómago en el esófago), edad (la EPOC se desarrolla lentamente con los años, por lo que la mayoría de las personas tienen al menos 40 años de edad cuando empiezan los síntomas) y la genética (un trastorno genético raro conocido como la deficiencia de alfa-1-antitripsina es la fuente de algunos casos de EPOC).

Las complicaciones o síntomas asociados de la EPOC pueden incluir un riesgo elevado de infecciones respiratorias, hipertensión arterial, problemas del corazón (por ejemplo, infartos de miocardio, arritmias, cardiopatías pulmonares), cáncer de pulmón (los fumadores con bronquitis crónica tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón que los fumadores que no tienen bronquitis crónica), neumonía, neumotórax y depresión, entre otros conocidos en la técnica. Los ejemplos adicionales incluyen tos que produce moco y puede estar manchado de sangre, fatiga, infecciones respiratorias frecuentes, cefaleas, falta de aliento (disnea) que empeora con actividad leve, hinchazón de los tobillos, pies o piernas, que afecta a ambos lados del cuerpo, y sibilancias. Los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 se pueden usar para reducir o gestionar las complicaciones o síntomas

asociados a la EPOC u otras afecciones pulmonares relacionadas con la inflamación.

Los sujetos con EPOC se pueden identificar según técnicas de diagnóstico establecidas conocidas en la técnica. Por ejemplo, las pruebas de la función pulmonar, tales como espirometría, miden cuánto aire pueden contener los pulmones y cómo de rápido un individuo puede soltar el aire de sus pulmones. La espirometría puede detectar la EPOC antes de la aparición de los síntomas, y también se puede usar para seguir la progresión de la enfermedad y monitorizar el tratamiento. Además, la radiografía del tórax muestra enfisema, una de las principales causas de la EPOC, y también puede descartar otros problemas pulmonares o insuficiencia cardíaca. Además, el análisis del gas en la sangre arterial mide cómo se eficazmente llevan los pulmones el oxígeno a la sangre y retiran el dióxido de carbono, proporcionando una indicación de EPOC. El examen de esputo, es decir, el análisis de las células en el esputo, puede identificar la causa de ciertos problemas pulmonares y ayudar a descartar ciertos cánceres de pulmón. Por tanto, la tomografía computerizada (TAC) puede producir imágenes altamente detalladas de los órganos internos, que puede ayudar a detectar el enfisema y así la EPOC.

Como en cualquier parte en el presente documento, la cantidad de agente antisentido o de iARN dirigido al gen de señalización IL-17 administrado a un sujeto con EPOC (o en riesgo de EPOC) dependerá de las características de ese sujeto, tales como la salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos, así como el grado, la intensidad y el tipo de reacción al agente. Por ejemplo, se pueden utilizar múltiples administraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.), normalmente a una frecuencia definida (número de administraciones por día, por semana, por mes, etc.).

También se incluyen terapias de combinación. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o más agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 en combinación con otros tratamientos para la inflamación pulmonar o EPOC. Los ejemplos de dichos tratamientos incluyeron, sin limitación, cambios del estilo de vida, tales como dejar de fumar o fumar menos u otra exposición a irritantes pulmonares, rehabilitación pulmonar, el uso de broncodilatadores (por ejemplo, ipratropio, tiotropio, salmeterol, formoterol), esteroides tales como corticosteroides, antibióticos, inhaladores de dosis medida (MDI) e inhaladores de polvo seco (DPI), nebulizadores, terapia génica de reemplazo para la deficiencia de alfa-1-antitripsina, oxigenoterapia y cirugía, que incluye bulectomía, cirugía de reducción del volumen pulmonar y trasplante de pulmón.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al sistema gastrointestinal, que incluyen inflamación, infecciones y cáncer asociado a la boca, esófago, estómago, intestinos delgados, intestinos gruesos y recto. La "inflamación gastrointestinal", como se usa en el presente documento, se refiere a la inflamación de una capa de mucosa del tubo gastrointestinal, y engloba afecciones inflamatorias agudas y crónicas. La inflamación aguda se caracteriza, en general, por un corto tiempo de aparición e infiltración o entrada de neutrófilos. La inflamación crónica se caracteriza, en general, por un periodo de aparición relativamente más largo y la infiltración o entrada de células mononucleares. La inflamación crónica también se puede caracterizar normalmente por periodos de remisión espontánea y manifestación espontánea. La "capa de mucosa del tubo gastrointestinal" pretende incluir mucosa del intestino (incluyendo el intestino delgado y el intestino grueso), recto, revestimiento del estómago (gástrico), cavidad bucal y similares.

"Inflamación gastrointestinal crónica" se refiere a la inflamación de la mucosa del tubo gastrointestinal que se caracteriza por un periodo de aparición relativamente más largo, es duradera (por ejemplo, de varios días, semanas, meses o años y hasta toda la vida del sujeto), y se asocia frecuentemente a infiltración o entrada de células mononucleares, y se puede asociar además a periodos de remisión espontánea y manifestación espontánea. Las "afecciones inflamatorias gastrointestinales crónicas" (también denominadas "enfermedades inflamatorias gastrointestinales crónicas") que tienen dicha inflamación crónica incluyen, pero no se limitan a, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis inducida por agresiones medioambientales (por ejemplo, inflamación gastrointestinal asociada a una pauta terapéutica, tal como quimioterapia, radioterapia y similares), colitis en afecciones tales como enfermedad granulomatosa crónica (véase, por ejemplo, Schappi et al., Arch Dis Child. 84:147-151, 2001), enfermedad celíaca, celiaquía (es decir, una enfermedad hereditaria en la que se inflama el revestimiento intestinal en respuesta a la ingestión de una proteína conocida como gluten), alergias alimentarias, gastritis, gastritis infecciosa o enterocolitis (por ejemplo, gastritis activa crónica infectada por *Helicobacter pylori*) y otras formas de inflamación gastrointestinal provocadas por un agente infeccioso, y otras afecciones similares.

Como se usa en el presente documento, "enfermedad inflamatoria del intestino" o "EII" se refiere a cualquiera de una variedad de enfermedades caracterizadas por inflamación de todo o parte de los intestinos. Los ejemplos de la enfermedad inflamatoria del intestino incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. El término EII incluye colitis pseudomembranosa, colitis hemorrágica, colitis por síndrome hemolítico-urémico, colitis colagenosa, colitis isquémica, colitis por radiación, colitis inducida por fármacos y químicamente, colitis por desviación, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, síndrome del colon irritable y enfermedad de Crohn; y dentro de la enfermedad de Crohn todos los subtipos que incluyen activa, refractaria y fistulizante y enfermedad de Crohn. Por tanto, los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 se pueden emplear para tratar o gestionar una cualquiera o más de estas afecciones.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al sistema

vascular, o inflamación vascular, tal como inflamación asociada a los vasos sanguíneos y el corazón. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al sistema vascular incluyen, sin limitación, miocarditis, pericarditis, enfermedad oclusiva, aterosclerosis, infarto de miocardio, trombosis, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII, vasculitis necrotizante de vasos pequeños, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante focal poco inmunitaria, glomerulonefritis crescéntica, síndrome antifosfolípidos, insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmunitaria, autoinmunidad cardíaca en enfermedad de Chagas y autoinmunidad anti-linfocitos T cooperadores. También se incluyen endocarditis, o infección de las válvulas del corazón con diseminación de pequeños clústeres de bacterias a través de la circulación sanguínea, flebitis o vasculitis, inflamación de una o más venas, y tromboflebitis, inflamación de las venas relacionada con un trombo. La tromboflebitis puede ocurrir repetidamente en diferentes localizaciones, y entonces se denomina tromboflebitis migrans, o tromboflebitis migratoria. La flebitis se puede asociar con una variedad de causas, tales como infección bacteriana, exposición a agentes químicos, tales como disoluciones irritantes o vesicantes, traumatismo físico de perforación de la piel, tal como movimiento de una cánula en la vena durante la inserción, medicaciones tales como celebrex, olanzepina, antidepresivos y otros, y alcoholismo. Ciertas realizaciones se pueden referir a tratar o gestionar la inflamación del corazón provocada por una cualquiera o más de fiebre reumática aguda, toxoplasmosis congénita, infección prenatal por enterovirus, enfermedad de Lyme y fiebre reumática.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al hígado o la vesícula biliar, que incluyen inflamación aguda y crónica del hígado, y colecistitis aguda y crónica. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al hígado o a la vesícula biliar incluyen, sin limitación, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis viral (por ejemplo, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, mononucleosis, rubeola, virus de Epstein-Barr y citomegalovirus), otras causas de hepatitis tales como intensa infección bacteriana, infecciones amebianas, medicinas (por ejemplo, agomelatina, alopurinol, amitriptilina, amiodarona, asatioprina, paracetamol, halotano, ibuprofeno, indometacina, isoniazida, rifampicina, pirazinamida, ketoconazol, loratadina, metotrexato, metildopa, minociclina, nifedipino, nitrofurantoína, fenitoína, ácido valproico, troglitazona, zidovudina), toxinas (por ejemplo, alcohol, toxinas fúngicas) y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedad de Wilson, un trastorno del metabolismo del cobre en el cuerpo, hemocromatosis, trastorno del metabolismo del hierro en el cuerpo, esteatohepatitis no alcohólica, deficiencia de alfa 1-antitripsina). Los ejemplos adicionales incluyen enfermedad del hígado graso no alcohólica, cirrosis tales como cirrosis biliar primaria, ictericia obstructiva, hepatitis isquémica y enfermedad de la vesícula biliar.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al sistema linfático/inmunitario. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al sistema linfático/inmunitario incluyen, sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, tales como enfermedad de Chagas, trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC), enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes mellitus de tipo I, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, enfermedad de Kawasaki, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, lupus eritematoso, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, morfea, miastenia grave, narcolepsia, neuromiotonia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, poliomiocitis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide, esquizofrenia, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, arteritis temporal, colitis ulcerosa, vitiligo y granulomatosis de Wegener, además de anemia hemolítica autoinmunitaria y diversas linfadenopatías.

También se incluyen afecciones inflamatorias inmunorrelacionadas asociadas al trasplante de un injerto, tejido, célula u órgano, tales como rechazo del injerto, rechazo crónico del injerto, rechazo subagudo del injerto, rechazo hiperagudo del injerto, rechazo agudo del injerto y enfermedad injerto contra huésped. En ciertas realizaciones, los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 se pueden administrar a un donante de trasplante antes o durante la retirada del tejido. En ciertas realizaciones, los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 se pueden administrar a un receptor de trasplante antes, durante y/o después de la terapia del trasplante para reducir las complicaciones relacionadas con la inflamación de la terapia del trasplante. Los ejemplos de terapias de trasplante incluyen médula ósea, célula madre, sangre periférica, hígado, pulmón, corazón, piel y riñón, entre otros conocidos en la técnica. Los ejemplos adicionales incluyen afecciones inflamatorias asociadas a alergias, tales como asma, ronchas, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros del polvo, alergia a veneno de arañas o serpientes, alergia a los cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia a fármacos, alergia a las picaduras de insectos, alergia a la caspa de los animales, alergia a plantas urticantes, alergia a la hiedra venenosa y alergia alimentaria.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al aparato genitourinario. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al aparato genitourinario incluyen, sin limitación, inflamaciones, infecciones o cánceres del uréter, vejiga, uretra, cuello uterino, trompas de Falopio, ovarios, útero, matriz, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epidídimo, próstata, vesículas seminales, testículos o riñones. También se incluyen nefritis intersticial autoinmunitaria, absceso renal (intrarrenal o extrarrenal), prostatitis aguda, hematuria, uretritis (por ejemplo, clamidia y otras enfermedades de transmisión sexual), enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) y absceso prostático. También se incluye nefritis asociada con uno o más de glomerulonefritis, nefritis lúpica, nefropatía, gota, venenos o productos químicos (por ejemplo, éter, sulfato de talio), ciertas medicaciones (por

ejemplo, piroxicam, Candy, Feldene Gel, fensaid, pirox), síndrome de Herrmann, fiebre amarilla, enfermedades complejas inmunitarias, fiebre tifoidea, estenosis uretral, tuberculosis renal y glomerulonefritis posestreptocócica.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al sistema musculoesquelético. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al sistema musculoesquelético incluyen, sin limitación, artritis tales como artritis reumatoide y artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, miositis autoinmunitaria, síndrome de Sjogren primario, enfermedad autoinmunitaria del músculo liso, miositis, polimiositis, tendinitis, inflamación de ligamentos, inflamación de cartilago, inflamación de las articulaciones, inflamación sinovial, síndrome del túnel carpiano, inflamación crónica de los músculos e inflamación ósea, que incluye inflamación ósea asociada a osteoporosis y osteoartritis. También se incluyen síndrome de Tietze, una hinchazón benigna, dolorosa y no supurativa localizada en las articulaciones costoesternales, esternoclaviculares o costocondrales, costocondritis, síndrome esternal, xifoidalgia, subluxación esternoclavicular espontánea, hiperostosis esternocostoclavicular, fibromialgia, tendinitis o bursitis del hombro, artritis gotosa, polimialgia reumática, lupus eritematoso, espolones óseos y fracturas tales como fracturas por sobrecarga.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas al sistema endocrino. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al sistema endocrino incluyen, sin limitación, inflamación, infección o cáncer asociado al hipotálamo, pituitaria, tiroides, páncreas o glándulas suprarrenales, enfermedades glandulares tales como enfermedad pancreática, diabetes tales como diabetes de tipo I, enfermedad de la tiroides, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad antiespermática autoinmunitaria, prostatitis autoinmunitaria y síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I.

Ciertas realizaciones se refieren a reducir las respuestas inflamatorias y las afecciones asociadas a tejidos adiposos, un participante activo en la regulación de los procesos fisiológicos y patológicos, que incluyen inmunidad e inflamación. Los macrófagos son componentes del tejido adiposo y participan activamente en sus actividades. Además, la comunicación cruzada entre linfocitos y adipocitos puede conducir a la regulación inmunitaria. El tejido adiposo produce y libera una variedad de factores pro-inflamatorios y antiinflamatorios, que incluyen las adipocinas leptina, adiponectina, resistina y visfatina, así como citocinas y quimiocinas, tales como TNF-alfa, IL-6, proteína quimioatrayente de monocitos 1 y otros. Las moléculas proinflamatorias producidas por el tejido adiposo participan como participantes activos en el desarrollo de la resistencia a la insulina y el aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular asociada a obesidad. A diferencia, los reducidos niveles de leptina pueden predisponer al aumento de la susceptibilidad a la infección provocada por las reducidas respuestas de linfocitos T en individuos desnutridos. Se han observado niveles alterados de adipocinas en una variedad de afecciones inflamatorias (véase, por ejemplo, Fantuzzi, *J Allergy Clin Immunol.* 115:911-19, 2005; y Berg et al., *Circulation Research.* 96:939, 2005).

También se pueden emplear agentes antisentido y de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 para tratar o gestionar la inflamación asociada a hipersensibilidad. Los ejemplos de dichas condiciones incluyen hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpo, hipersensibilidad mediada por inmunocomplejo, hipersensibilidad mediada por linfocitos T e hipersensibilidad de tipo retrasada.

Los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 también se pueden emplear para tratar o gestionar afecciones auto-inflamatorias. Los ejemplos de afecciones auto-inflamatorias incluyen fiebre mediterránea familiar, síndrome periódico asociado a receptores de TNF (TRAPS), síndrome de hiper-IgD (HIDS), enfermedades relacionadas con *CIAS1* tales como síndrome de Muckle- Wells, síndrome autoinflamatorio frío familiar y enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal, síndrome de PAPA (artritis estéril piogénica, pioderma gangrenosa, acné) y síndrome de Blau.

Los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 se pueden emplear para tratar o gestionar la inflamación asociada a una variedad de cánceres. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer cerebral, melanoma, cáncer de piel no de melanoma, cáncer de huesos, linfoma, leucemia, cáncer de tiroides, cáncer endometrial, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, neuroblastoma, glioblastoma y linfoma no Hodgkin.

Como se observa anteriormente, ciertas realizaciones pueden emplear agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 para modular la inflamación sistémica, tal como para reducir o gestionar la inflamación sistémica. En ciertas realizaciones, la inflamación sistémica se puede asociar a síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), una afección inflamatoria de todo el cuerpo con una variedad de posibles causas. El SRIS se puede caracterizar o identificar según técnicas de diagnóstico rutinarias. Como un ejemplo no limitante, el SRIS se puede identificar por la presencia de dos o más de los siguientes: (i) una temperatura corporal que es inferior a 36 °C o superior a 38 °C, (ii) una frecuencia cardíaca que es superior a 90 latidos por minuto, (iii) taquipnea (alta frecuencia respiratoria), con más de 20 respiraciones por minuto; o, una presión parcial arterial de dióxido de carbono inferior a 4,3 kPa (32 mmHg), y (iv) número de leucocitos inferior a 4000 células/mm<sup>3</sup> (4 x 10<sup>9</sup> células/l) o superior a 12.000 células/mm<sup>3</sup> (12 x 10<sup>9</sup> células/l); o la presencia de más de 10 % de neutrófilos inmaduros (formas de bandas).

El SRIS se clasifica ampliamente como infeccioso o no infeccioso. Más en general, el SRIS infeccioso se asocia a septicemia, un estado inflamatorio de todo el cuerpo combinado con una infección conocida o de la que se sospecha, que incluye bacteremia, viremia, parasitemia y síndrome de choque tóxico. La septicemia se puede asociar a una amplia variedad de agentes infecciosos, que incluyen, sin limitación, bacterias tales como *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* negativo para coagulasa, *Staphylococcus aureus*, especies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Enterobacter*, *S. agalactiae*, especies de *Serratia*, especies de *Acinetobacter*, *Streptococcus pneumoniae*, especies de *Salmonella* y *Neisseria meningitidis*; virus tales como rubeola, citomegalovirus, herpes simple y el virus de la varicela; parásitos tales como en infección por malaria (por ejemplo, *Plasmodium falciparum*), tripanosomiasis y filariasis; y hongos tales como especies de *Candida*, especies de *Aspergillus*, especies de *Histoplasma*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* y *Pneumocystis carinii*. En ciertos casos, las infecciones en los pulmones (por ejemplo, neumonía), vejiga y riñones (por ejemplo, infecciones de las vías urinarias), piel (por ejemplo, celulitis), abdomen (por ejemplo, apendicitis) y otras áreas (por ejemplo, meningitis) se pueden extender y conducir a septicemia. Se pueden usar agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 para modular la inflamación asociada a cualquiera de estos agentes infecciosos, si la septicemia está presente o no.

El SRIS no infeccioso se puede asociar a traumatismo, quemaduras, pancreatitis, isquemia, hemorragia, complicaciones quirúrgicas, insuficiencia suprarrenal, embolia pulmonar, aneurisma aórtica, taponamiento cardíaco, anafilaxia y sobredosis de fármacos, entre otros. El SRIS se complica frecuentemente por el fallo de uno o más órganos o sistema de órganos, que incluyen los descritos en el presente documento. Los ejemplos específicos incluyen lesión pulmonar aguda, lesión renal aguda, choque y síndrome de disfunción multiorgánica, entre otros. Normalmente, el SRIS se trata centrándose en el problema subyacente (por ejemplo, reemplazo de líquidos suficiente para hipovolemia, IVF/NPO para pancreatitis, epinefrina/esteroides/benadrilo para anafilaxia). En ciertos casos, el selenio, la glutamina y el ácido eicosapentaenoico han mostrado eficacia en mejorar los síntomas del SRIS, y también pueden ser útiles antioxidantes tales como la vitamina E. Por tanto, se pueden usar agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 para tratar o gestionar SRIS y las complicaciones de SRIS, solos o en combinación con otras terapias.

La inflamación sistémica también se puede asociar a "tormenta de citocinas", una reacción inmunitaria peligrosa provocada por un bucle de retroalimentación positiva entre citocinas y células inmunitarias, dando como resultado niveles altamente elevados de diversas citocinas. En ciertos casos, la tormenta de citocinas (hipercitocinemia) incluye la liberación sistémica de numerosos mediadores inflamatorios conocidos, tales como citocinas, radicales libres de oxígeno y factores de coagulación). Se incluyen niveles elevados de citocinas proinflamatorias tales como TNF-alfa, IL-1 e IL-6, y citocinas antiinflamatorias tales como antagonista de receptores de IL-10 e IL-1. Las tormentas de citocinas pueden ocurrir en varias enfermedades infecciosas y no infecciosas que incluyen enfermedad injerto contra huésped (EICH), síndrome disneico agudo (SDA), septicemia, gripe aviar, viruela y SRIS. La tormenta de citocinas también se puede inducir por ciertas medicaciones. El tratamiento incluye OX40 IG, que reduce las respuestas de linfocitos T, inhibidores de ACE, bloqueantes de los receptores de angiotensina II, corticosteroides, gemfibrozilo, sequestrantes de radicales libres y bloqueantes de TNF- $\alpha$ . Por consiguiente, se pueden emplear agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 para tratar o gestionar la tormenta de citocinas, sola o en combinación con otras terapias.

Ciertas realizaciones pueden emplear agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 para reducir una cualquiera o más de inflamación granulomatosa, inflamación fibrinosa, inflamación purulenta, inflamación serosa o inflamación ulcerativa. La inflamación granulomatosa se caracteriza por la formación de granulomas, normalmente resultante de una respuesta a agentes infecciosos tales como tuberculosis, lepra y sífilis. La inflamación fibrinosa resulta de un gran aumento en la permeabilidad vascular, que permite que la fibrina pase a través de los vasos sanguíneos. Si está presente un estímulo procoagulativo apropiado, tal como una célula cancerosa, se deposita un exudado fibrinoso. Este proceso se observa comúnmente en cavidades serosas, donde la conversión de exudado fibrinoso en una cicatriz puede ocurrir entre membranas serosas, limitando su función. La inflamación purulenta resulta de la formación de una gran cantidad de pus, que consiste en neutrófilos, células muertas y fluido. La infección por bacterias piogénicas, tal como estafilococos, es característica de este tipo de inflamación. Conjuntos localizados grandes de pus rodeados por tejidos circundantes se denominan abscesos. La inflamación serosa se caracteriza por la copiosa efusión de fluido seroso no viscoso, comúnmente producido por células mesoteliales de membranas serosas, pero también puede ser obtenido de plasma sanguíneo. Los ejemplos de este tipo de inflamación incluyen ampollas de la piel. La inflamación ulcerativa, que normalmente ocurre cerca de un epitelio, da como resultado la pérdida necrótica de tejido de la superficie, exponiendo así las capas de tejido más bajas. La posterior excavación del epitelio se conoce como una úlcera.

También se pueden emplear agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 en el tratamiento de lesiones o heridas físicas. Los ejemplos son abrasiones, cardenales, cortes, heridas por perforación, laceraciones, heridas por impacto, contusiones, quemaduras, quemaduras térmicas, congelaciones, quemaduras químicas, quemaduras solares, gangrena, necrosis, desecaciones, quemaduras por radiación, quemaduras por radiactividad, inhalación de humo, desgarros musculares, distensiones musculares, desgarros de tendones,

distensiones de tendones, distensiones de ligamentos, desgarros de ligamentos, hiperextensiones, desgarró de cartílago, fracturas óseas, pinzamientos de nervios, úlceras y disparos u otras heridas traumáticas.

Los agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 también se pueden emplear para tratar o gestionar la inflamación idiopática o inflamación de etiología desconocida. También se incluyen terapias de combinación, en las que uno o más agentes antisentido o de iARN dirigidos al gen de señalización IL-17 se administran o utilizan en combinación con una o varias de otras terapias para cualquiera de las enfermedades o afecciones inflamatorias descritas en el presente documento, que incluyen las terapias que están comúnmente disponibles y conocidas en la técnica. Los ejemplos de terapias de combinación incluyen el uso de agentes antiinflamatorios habituales tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), derivados antiinflamatorios selectivos inmunitarios (DAISi) y esteroides (por ejemplo, corticosteroides), antiinfecciosos tales como antibióticos y agentes antivirales, antioxidantes, citocinas, agentes quimioterapéuticos y otras terapias contra el cáncer y terapias inmunosupresoras.

Los criterios para evaluar los signos y los síntomas de las afecciones inflamatorias y otras afecciones, que incluyen para los fines de hacer un diagnóstico diferencial y también para monitorizar los tratamientos, tales como determinar si una dosis terapéuticamente eficaz se ha administrado en el transcurso del tratamiento, por ejemplo, determinando la mejora según criterios clínicos aceptados, serán evidentes para los expertos en la técnica y se ejemplifican por las enseñanzas de, por ejemplo, Berkow et al., eds., *The Merck Manual*, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman et al., eds., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 3ª edición, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987); Ebadi, *Pharmacology*, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Osolci al., eds., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology*, Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992).

Ciertas realizaciones incluyen la modulación de los genes de señalización de IL-17, tales como IL-17RC, para el tratamiento de afecciones autoinmunitarias. Los ejemplos de afecciones autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia prenatal autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, autoinmunitocitopenia, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípidos, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, miocarditis, policondritis recidivante, enfermedad cardíaca reumática, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía por IgA), esclerosis múltiple, neuritis, uveítis oftálmica, poliendocrinopatías, púrpura (por ejemplo, púrpura de Henoch-Schonlein), enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, inflamación pulmonar autoinmunitaria, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus dependiente de insulina y enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria.

Las enfermedades autoinmunitarias, trastornos o afecciones adicionales incluyen, pero no se limitan a, tiroiditis autoinmunitaria; hipotiroidismo, que incluye tiroiditis de Hashimoto y tiroiditis caracterizada, por ejemplo, por citotoxicidad mediada por célula y tiroidea humoral; SLE (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por inmunocomplejos circulantes y locamente generados); síndrome de Goodpasture (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos basales antimembrana); pénfigo (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos acantolíticos epidérmicos); autoinmunitades del receptor tales como, por ejemplo, enfermedad de Graves (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos contra un receptor de la hormona estimulante tiroidea; miastenia grave, que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos contra el receptor de la acetilcolina); resistencia a la insulina (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por anticuerpos contra el receptor de la insulina); anemia hemolítica autoinmunitaria (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por fagocitosis de glóbulos rojos sensibilizados a anticuerpos); y púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (que se caracteriza frecuentemente, por ejemplo, por la fagocitosis de plaquetas sensibilizadas a anticuerpos).

Una pauta de tratamiento *in vivo* eficaz que usa los oligonucleótidos antisentido o agentes de iARN de la invención puede variar según la duración, dosis, frecuencia y vía de administración, así como la afección del sujeto en tratamiento (es decir, administración profiláctica frente a administración en respuesta a una afección existente). Por consiguiente, dicha terapia *in vivo* requerirá frecuentemente la monitorización por pruebas apropiadas al tipo particular de infección viral en tratamiento, y ajustes correspondientes en la dosis o pauta de tratamiento, para lograr un desenlace terapéutico óptimo. En ciertas realizaciones, el tratamiento se puede monitorizar, por ejemplo, por indicadores generales de inflamación.

#### FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones o composiciones adecuadas para la administración terapéutica de oligómeros antisentido u otros agentes tales como agentes de iARN, como se describe en el presente documento. Por tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los oligómeros o agentes descritos en el presente documento, formuladas junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Aunque es posible que un oligómero de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

Los métodos para la administración de moléculas de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; y Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et al., documento PCT WO 94/02595. Estos y otros protocolos se pueden utilizar para la administración de

5 prácticamente cualquier molécula de ácido nucleico, que incluye los oligómeros aislados de la presente invención.

Como se detalla más adelante, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular especialmente para administración en forma sólida o líquida, que incluye las adaptadas para lo siguiente: (1)

10 administración por vía oral, por ejemplo, rociados (disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, los dirigidos para absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una disolución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida;

15 (3) administración tópica, por ejemplo, como una crema, pomada, o un parche de liberación controlada o espray aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o por vía intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; o (8) por vía nasal.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance de criterio médico sensato, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva

20 toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, adyuvante de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco estearato de magnesio, calcio o cinc, o ácido esteárico), o

25 material de encapsulación de disolvente, implicado en llevar o transportar el compuesto objeto de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de formulación y no perjudicial para el paciente.

Algunos ejemplos de los materiales que pueden servir de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de

30 celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disolución de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias

35 compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Los ejemplos no limitantes adicionales de agentes adecuados para la formulación con los oligómeros antisentido de la presente invención incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG, ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos, ácidos nucleicos que contienen restos lipófilos, fosforotioatos, inhibidores de P-glucoproteínas (tales como Pluronic P85) que pueden potenciar la entrada de fármacos en diversos tejidos; polímeros biodegradables, tales como

40 microesferas de poli(DL-lactida-co-glicolida) para la administración por liberación sostenida después de la implantación (Emerich, DF et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; y nanopartículas cargadas, tales como las fabricadas de poli(cianoacrilato de butilo), que pueden suministrar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de captación neuronal (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

La invención también caracteriza el uso de la composición que comprende liposomas modificados en la superficie que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (modificados con PEG, ramificados y no ramificados o combinaciones de los mismos, o liposomas de larga circulación o liposomas ocultos). Los oligómeros de la invención también pueden

55 comprender moléculas de PEG covalentemente unidas de diversos pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método de aumento de la acumulación de fármacos en tejidos diana. Esta clase de vehículos de fármaco resiste la opsonización y eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), permitiendo así tiempos de circulación en sangre más largos y exposición mejorada a tejido para el fármaco encapsulado (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Se ha mostrado que dichos liposomas se acumulan selectivamente en tumores, supuestamente por extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Los liposomas de larga circulación potencian la farmacocinética y la farmacodinámica de ADN y ARN, particularmente en comparación con liposomas catiónicos convencionales que se conoce que se acumulan en

60 tejidos del MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 24864-24870; Choi et al., publicación PCT internacional N° WO 96/10391; Ansell et al., publicación PCT internacional N° WO 96/10390; Holland et al., publicación PCT internacional N° WO 96/10392). También es probable que los liposomas de larga circulación protejan los fármacos

de la degradación por nucleasas a un grado mayor en comparación con los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en tejidos de MPS metabólicamente agresivos tales como el hígado y el bazo.

5 En una realización adicional, la presente invención incluye composiciones de oligómero preparadas para la administración como se describe en las patentes de EE. UU. N° 6.692.911, 7.163.695 y 7.070.807. A este respecto, en una realización, la presente invención proporciona un oligómero de la presente invención en una composición que comprende copolímeros de lisina y histidina (HK) como se describe en las patentes de EE. UU. 7.163.695, 7.070.807 y 6.692.911 tanto solos como en combinación con PEG (por ejemplo, PEG ramificado o no ramificado o una mezcla de ambos), en combinación con PEG y un resto diano o cualquiera de los anteriores en combinación con un agente de reticulación. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona oligómeros antisentido en 10 composiciones que comprenden polihistidina modificada con ácido glucónico o polihistidina/transferrina-polilisina gluconilada. Un experto en la técnica también reconocerá entonces que dentro de la composición se pueden sustituir los aminoácidos con propiedades similares a His y Lys.

15 Ciertas realizaciones de los oligómeros descritos en el presente documento pueden contener un grupo funcional básico, tal como amino o alquilamino, y son, así, capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a este respecto a las sales de adición de ácido relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden preparar *in situ* en el vehículo de administración o el proceso de fabricación de formas farmacéuticas, o haciendo reaccionar por separado un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislar la sal así formada durante la posterior purificación. Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares (véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19). 20 25

Las sales farmacéuticamente aceptables de los oligómeros objeto incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los compuestos, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotiónico y similares. 30

35 En ciertas realizaciones, los oligómeros de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácido y, así, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de base relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden asimismo preparar *in situ* en el vehículo de administración o el proceso de fabricación de la forma farmacéutica, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoniaco, o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérricas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., arriba). 40 45

Los agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como los agentes colorantes, liberan agentes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, también pueden estar presentes en las composiciones conservantes y antioxidantes. 50

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propilgalato de lecitina, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares. 55

Las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica única variará dependiendo del hospedador que está tratándose, el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica única será, en general, aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. 60 65 En general, del cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente 5 por ciento hasta

aproximadamente 70 por ciento, lo más preferentemente desde aproximadamente 10 por ciento hasta aproximadamente 30 por ciento.

5 En ciertas realizaciones, una formulación de la presente invención comprende un excipiente seleccionado de ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes formadores de micelas, por ejemplo, ácidos biliares, y vehículos poliméricos, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un oligómero de la presente invención. En ciertas realizaciones, una formulación anteriormente mencionada convierte en biodisponible por vía oral un oligómero de la presente invención.

10 Los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de poner en asociación un oligómero de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente dividido, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

15 Las formulaciones de la invención adecuadas para administración por vía oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) y/o como enjuagues bucales y similares, que contiene cada uno una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como principio activo. Un oligómero de la presente invención también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

25 En las formas farmacéuticas sólidas de la invención para administración por vía oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos, trociscos y similares), el principio activo se puede mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o sustancias de relleno, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario y tensioactivos, tales como poloxámero y laurilsulfato de sodio; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y tensioactivos no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, estearato de cinc, estearato de sodio, ácido esteárico y mezclas de los mismos; (10) agentes colorantes; y (11) agentes de liberación controlada tales como crospondona o etilcelulosa. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura usando dichos excipientes como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

45 Se puede preparar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Los comprimidos por compresión se pueden preparar usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

50 Los comprimidos, y otras formas farmacéuticas sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos, se pueden ranurar opcionalmente o preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en el arte de la formulación farmacéutica. También se puede formular de manera que se proporcione la liberación lenta o controlada del principio activo en su interior usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas. Se pueden formular para la rápida liberación, por ejemplo, liofilizar. Se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente opacificantes y pueden ser de una composición que liberan el (los) principio(s) activo(s) solos, o preferentemente, en una cierta porción del tubo gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de incorporación de las composiciones que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.

65 Las formas farmacéuticas líquidas para administración por vía oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables.

Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en el recto o cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.

Las formulaciones o formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un oligómero como se proporcionan en el presente documento incluyen polvos, esprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. Los oligómeros activos se pueden mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón, o propulsor que se pueda requerir. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de la presente invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y esprays pueden contener, además de un oligómero de la presente invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicato de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los esprays pueden contener además propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles sin sustituir, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la liberación controlada de un oligómero de la presente invención al cuerpo. Dichas formas farmacéuticas se pueden preparar disolviendo o dispersando el oligómero en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del agente a través de la piel. La tasa de dicho flujo se puede controlar o proporcionando una membrana de control de la tasa o dispersando el agente en una matriz de polímero o gel, entre otros métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más oligómeros de la invención en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas y estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones, y usando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos sobre los oligómeros objeto se puede garantizar por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También se puede desear incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, se puede provocar la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retardan la absorción, tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es conveniente ralentizar la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede llevar a cabo usando una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua, entre otros métodos conocidos en la técnica. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se lleva a cabo disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite.

Se pueden preparar formas de liberación prolongada inyectables formando matrices de microencapsulación de los

oligómeros objeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación entre oligómero y polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la tasa de liberación del oligómero. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de liberación prolongada también se pueden preparar atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos del cuerpo.

Cuando los oligómeros de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a los seres humanos y animales, se pueden administrar por sí mismos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1 a 99 % (más preferentemente, 10 a 30 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se observa anteriormente, las formulaciones o preparaciones de la presente invención se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral, por vía tópica o por vía real. Normalmente se administran en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en comprimidos o forma de cápsula, por inyección, inhalación, loción ocular, pomada, supositorio, etc., administración por inyección, infusión o inhalación; tópica por loción o pomada; y rectal por supositorios.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal, e infusión.

Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado periféricamente", como se usa en el presente documento, significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material distinto directamente en el sistema nervioso central, de forma que entre en el sistema del paciente y así se someta a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los oligómeros de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se pueden formular en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos para los expertos en la técnica. Se pueden variar los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser inaceptablemente tóxicos para el paciente.

El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del oligómero particular de la presente invención empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el momento de administración, la velocidad de eliminación o el metabolismo del oligómero particular que se emplea, la tasa y el grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el oligómero particular empleado, la edad, sexo, peso, afección, salud general y antecedentes médicos previos del paciente que está tratándose, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Un médico o veterinario que tiene experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría empezar la administración de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a las requeridas para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá, en general, de los factores descritos anteriormente. En general, las dosis oral, intravenosa, intracerebroventricular y subcutánea de los compuestos de la presente invención para un paciente, cuando se usa para los efectos indicados, variará desde aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día.

Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. En ciertas situaciones, la administración es una administración al día. En ciertas realizaciones, la administración es una o más administraciones cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, según se necesite, para tratar la afección deseada.

Se pueden administrar moléculas de ácidos nucleicos a las células mediante una variedad de métodos conocidos para los conocidos para la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. En ciertas realizaciones, se puede utilizar la tecnología de microemulsión para mejorar la biodisponibilidad de agentes

5 farmacéuticos lipófilos (insolubles en agua). Los ejemplos incluyen Trimetrine (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 y REV 5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Entre otros beneficios, la microemulsión proporciona biodisponibilidad potenciada dirigiendo preferentemente la absorción al sistema linfático en lugar del aparato circulatorio, que así evita el hígado, y previene la destrucción de los compuestos en la circulación hepatobiliar.

10 En un aspecto de invención, las formulaciones contienen micelas formadas a partir de un oligómero como se proporciona en el presente documento y al menos un vehículo anfífilico, en las que las micelas tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 100 nm. Las realizaciones más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 50 nm, e incluso realizaciones más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 30 nm, o incluso inferior a aproximadamente 20 nm.

15 Aunque se contemplan todos los vehículos anfífilicos adecuados, los vehículos presentemente preferidos son, en general, los que tienen, en general, estado reconocido como seguro (GRAS), y que pueden tanto solubilizar el compuesto de la presente invención como microemulsionarlo en una etapa posterior cuando la disolución se pone en contacto con una fase acuosa compleja (tal como una encontrada en el tubo gastrodigestivo humano). Normalmente, los componentes anfífilicos que cumplen estos requisitos tienen valores de HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo) de 2-20, y sus estructuras contienen radicales alifáticos de cadena lineal en el intervalo de C-6 a C-20. Los ejemplos son glicéridos grasos glicolizados con polietileno y polietilenglicoles.

20 Los ejemplos de vehículos anfífilicos incluyen glicéridos de ácidos grasos polietilenglicolizados saturados y monoinsaturados, tales como los obtenidos de diversos aceites vegetales completa o parcialmente hidrogenados. Dichos aceites pueden consistir ventajosamente en glicéridos de tri-, di-, y mono-ácidos grasos y ésteres de di- y mono-polietilenglicol de los ácidos grasos correspondientes, con una composición de ácidos grasos particularmente preferida que incluye ácido cáprico 4-10, ácido cáprico 3-9, ácido láurico 40-50, ácido mirístico 14-24, ácido palmítico 4-14 y ácido esteárico 5-15 %. Otra clase útil de vehículos anfífilicos incluye sorbitano y/o sorbitol parcialmente esterificados, con ácidos grasos saturados o mono-insaturados (serie SPAN) o análogos etoxilados correspondientes (serie TWEEN).

25 Los vehículos anfífilicos comercialmente disponibles pueden ser particularmente útiles, que incluyen las series Gelucire, Labrafil, Labrasol o Lauroglicol (todos fabricados y distribuidos por Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francia), mono-oleato de PEG, di-oleato de PEG, mono-laurato y di-laurato de PEG, lecitina, polisorbato 80, etc. (producido y distribuido por varias empresas en los EE. UU. y en todo el mundo).

30 En ciertas realizaciones, la administración puede ocurrir usando liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células hospedadoras adecuadas. En particular, las composiciones de la presente invención se pueden formular para la administración ya sea encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y el uso de dichos vehículos de administración se puede llevar a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

35 Los polímeros hidrófilos adecuados para su uso en la presente invención son los que son fácilmente solubles en agua, pueden estar covalentemente unidos a un lípido formador de vesículas, y que son tolerados *in vivo* sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Los polímeros adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico (también denominado polilactida), poliglicólico (también denominado poliglicolida), un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico y poli(alcohol vinílico). En ciertas realizaciones, los polímeros tienen un peso molecular de desde aproximadamente 100 o 120 dáltones hasta aproximadamente 5.000 o 10.000 dáltones, o desde aproximadamente 300 dáltones hasta aproximadamente 5.000 dáltones. En otras realizaciones, el polímero es polietilenglicol que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 5.000 dáltones, o que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 5.000 dáltones. En ciertas realizaciones, el polímero es polietilenglicol de 750 dáltones (PEG(750)). Los polímeros también se pueden definir por el número de monómeros en su interior; una realización preferida de la presente invención utiliza los polímeros de al menos aproximadamente tres monómeros, consistiendo dichos polímeros de PEG en tres monómeros (aproximadamente 150 dáltones).

40 Otros polímeros hidrófilos que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen polivinilpirrolidona, polimetoxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida y celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

45 En ciertas realizaciones, una formulación de la presente invención comprende un polímero biocompatible seleccionado del grupo que consiste en poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, polímeros de polivinilo, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas, polipropileno, polietilenos, poliestireno, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), polisacáridos, proteínas, poli(ácidos hialurónicos), policianoacrilatos y combinaciones, mezclas, o copolímeros de los mismos.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, que consisten en 6, 7 u 8 unidades de glucosa, designadas por la letra griega  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ , respectivamente. Las unidades de glucosa se unen por enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos. Como consecuencia de la conformación de silla de las unidades de azúcar, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) están situados en un lado del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primario en C-6 están situados en el otro lado. Como resultado, las caras externas son hidrófilas, que hace que las ciclodextrinas sean solubles en agua. A diferencia, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrófobas, puesto que están revestidas por el hidrógeno de los átomos C-3 y C-5, y por oxígenos de tipo éter. Estas matrices permiten la complejación con una variedad de compuestos relativamente hidrófobos, que incluyen, por ejemplo, compuestos esteroides tales como  $17\alpha$ -estradiol (véase, por ejemplo, van Uden et al. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:1-3-113 (1994)). La complejación tiene lugar por interacciones de Van der Waals y por la formación de enlaces de hidrógeno. Para una revisión general de la química de ciclodextrinas, véase, Wenz, Agnew. *Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

Las propiedades fisicoquímicas de los derivados de ciclodextrina dependen fuertemente del tipo y el grado de sustitución. Por ejemplo, su solubilidad en agua varía de insoluble (por ejemplo, triacetil-beta-ciclodextrina) a 147 % soluble (peso/volumen) (G-2-beta-ciclodextrina). Además, son solubles en muchos disolventes orgánicos. Las propiedades de las ciclodextrinas permiten el control de la solubilidad de diversos componentes de formulación aumentando o disminuyendo su solubilidad.

Se han descrito numerosas ciclodextrinas y métodos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I), et al. (patente de EE. UU. N° 3.453.259) y Gramera, et al. (patente de EE. UU. N° 3.459.731) describieron ciclodextrinas electroneutras. Otros derivados incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), patente de EE. UU. N° 3.453.257], ciclodextrinas reticuladas insolubles (Solms, patente de EE. UU. N° 3.420.788) y ciclodextrinas con propiedades aniónicas [Parmeter (III), patente de EE. UU. N° 3.426.011]. Entre los derivados de ciclodextrina con propiedades aniónicas, se han agregado a la ciclodextrina original ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiosfosfónicos, ácidos tiosulfínicos y ácidos sulfónicos [véase, Parmeter (III), arriba]. Además, se han descrito derivados de ciclodextrina de sulfoalquil éter por Stella, et al. (patente de EE. UU. N° 5.134.127).

Los liposomas consisten en al menos una membrana de bicapa lipídica que encierra un compartimento interno acuoso. Los liposomas se pueden caracterizar por el tipo de membrana y por el tamaño. Las vesículas unilaminares pequeñas (SUV) tienen una única membrana y normalmente varían entre 0,02 y 0,05  $\mu\text{m}$  de diámetro; las vesículas unilaminares grandes (LUV) normalmente son mayores que 0,05  $\mu\text{m}$ . Las vesículas oligolaminares grandes y las vesículas multilaminares tienen múltiples capas de membrana, normalmente concéntricas, y normalmente son mayores que 0,1  $\mu\text{m}$ . Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas más pequeñas contenidas dentro de una vesícula mayor, se llaman vesículas multivesiculares.

Un aspecto de la presente invención se refiere a formulaciones que comprenden liposomas que contienen un oligómero de la presente invención, donde la membrana del liposoma se formula para proporcionar un liposoma con elevada capacidad portadora. Alternativamente o además, el compuesto de la presente invención puede estar contenido dentro de, o adsorbido sobre, la bicapa de liposoma del liposoma. Un oligómero de la presente invención se puede agregar con un tensioactivo lipídico y ser llevado dentro del espacio interno del liposoma; en estos casos, la membrana del liposoma se formula para resistir los efectos perturbadores del agregado de agente activo-tensioactivo.

Según una realización de la presente invención, la bicapa de lípido de un liposoma contiene lípidos derivatizados con polietilenglicol (PEG), de forma que las cadenas de PEG se extienden desde la superficie interna de la bicapa de lípido en el espacio interior encapsulado por el liposoma, y se extienden desde el exterior de la bicapa lipídica en el entorno circundante.

Los agentes activos contenidos dentro de los liposomas de la presente invención están en forma solubilizada. Los agregados de tensioactivo y agente activo (tales como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) pueden estar atrapados dentro del espacio interior de los liposomas según la presente invención. Un tensioactivo actúa para dispersar y solubilizar el agente activo, y se pueden seleccionar de cualquier tensioactivo alifático, cicloalifático o aromático adecuado, que incluye, pero no se limita a, lisofosfatidilcolinas biocompatibles (LPC) de longitudes de cadena variables (por ejemplo, desde aproximadamente C14 hasta aproximadamente C20). También se pueden utilizar los lípidos derivatizados con polímero tales como los lípidos de PEG para la formación de micelas ya que actuarán inhibiendo la fusión micela/membrana, y a medida que disminuye la adición de un polímero a las moléculas de tensioactivo, disminuye la CMC del tensioactivo y ayuda en la formación de micelas. Se prefieren tensioactivos con CMC en el intervalo micromolar; se pueden utilizar tensioactivos de CMC más alta para preparar micelas atrapadas dentro de los liposomas de la presente invención.

Los liposomas según la presente invención se pueden preparar por cualquiera de una variedad de técnicas que se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.235.871; solicitud PCT publicada WO 96/14057; New RRC, *Liposomes: A practical approach*, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33-104; Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers BV, Ámsterdam, 1993. Por ejemplo, los liposomas de la presente invención se pueden preparar difundiendo un lípido derivatizado con un polímero hidrófilo

en liposomas preformados, tales como exponiendo liposomas preformados a micelas compuesta de polímeros injertados en lípidos, a concentraciones de lípidos correspondientes al porcentaje molar final de lípido derivatizado que se desea en el liposoma. Los liposomas que contienen un polímero hidrófilo también se pueden formar por homogeneización, hidratación del campo de los lípidos, o técnicas de extrusión, como se conoce en la técnica.

En otro procedimiento de formulación a modo de ejemplo, el agente activo se dispersa primero por sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro tensioactivos de CMC baja (incluyendo lípidos injertados en polímero) que solubilizan fácilmente las moléculas hidrófobas. La suspensión micelar resultante de agente activo se usa entonces para rehidratar una muestra de lípido secada que contiene un porcentaje molar adecuado de lípido injertado en polímero, o colesterol. La suspensión de lípido y agente activo se conforma entonces en liposomas usando técnicas de extrusión como se conoce en la técnica, y los liposomas resultantes se separan de la disolución no encapsulada por separación en columna habitual.

En un aspecto de la presente invención, los liposomas se preparan para tener tamaños sustancialmente homogéneos en un intervalo de tamaño seleccionado. Un método de dimensionamiento eficaz implica extruir una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme seleccionado; el tamaño de poro de la membrana se corresponderá aproximadamente con el mayor tamaño de los liposomas producidos por extrusión a través de esa membrana. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.737.323 (12 de abril de 1988). En ciertas realizaciones, se pueden utilizar reactivos tales como DharmaFECT® y Lipofectamine® para introducir polinucleótidos o proteínas en células.

Las características de liberación de una formulación de la presente invención dependen del material de encapsulación, la concentración del fármaco encapsulado y la presencia de modificadores de la liberación. Por ejemplo, la liberación se puede manipular para ser dependiente del pH, por ejemplo, usando un recubrimiento sensible al pH que libera solo a un bajo pH, como en el estómago, o un pH más alto, como en el intestino. Se puede usar un recubrimiento entérico para prevenir que la liberación ocurra hasta después del paso a través del estómago. Se pueden usar múltiples recubrimientos o mezclas de cianamida encapsuladas en diferentes materiales para obtener una liberación inicial en el estómago, seguido por la posterior liberación en el intestino. La liberación también se puede manipular por la inclusión de sales o agentes formadores de poros, que pueden aumentar la captación de agua o liberación de fármaco por difusión de la cápsula. También se pueden usar excipientes que modifican la solubilidad del fármaco para controlar la tasa de liberación. También se pueden incorporar agentes que potencian la degradación de la matriz o liberación de la matriz. Se pueden añadir al fármaco, añadidos como fase separada (es decir, como partículas), o se pueden co-disolver en la fase de polímero dependiendo del compuesto. En la mayoría de los casos, la cantidad debe ser entre 0,1 y el treinta por ciento (p/p de polímero). Los tipos de potenciadores de la degradación incluyen sales inorgánicas tales como sulfato de amonio y cloruro de amonio, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido benzoico y ácido ascórbico, bases inorgánicas tales como carbonato sódico, carbonato de potasio, carbonato cálcico, carbonato de cinc e hidróxido de cinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina y tensioactivos tales como Tween® y Pluronic®. Los agentes formadores de poros que añaden microestructura a las matrices (es decir, compuestos solubles en agua tales como sales inorgánicas y azúcares) se añaden como partículas. El intervalo normalmente es entre uno y el treinta por ciento (p/p de polímero).

La captación también se puede manipular alterando el tiempo de residencia de las partículas en el intestino. Esto se puede lograr, por ejemplo, recubriendo la partícula con, o seleccionando como material de encapsulación, un polímero adhesivo de la mucosa. Los ejemplos incluyen la mayoría de los polímeros con grupos carboxilo libres, tales como quitosano, celulosas y especialmente poliácridatos (como se usa en el presente documento, poliácridatos se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

Un oligómero se puede formular para estar contenido dentro de un dispositivo quirúrgico o médico o implante, o adaptado para ser liberado por éste. En ciertos aspectos, un implante se puede recubrir o tratar de otro modo con un oligómero. Por ejemplo, se pueden usar hidrogeles, u otros polímeros, tales como polímeros biocompatibles y/o biodegradables, para recubrir un implante con las composiciones de la presente invención (es decir, la composición se puede adaptar para su uso con un dispositivo médico usando un hidrogel u otro polímero). Se conocen bien en la técnica los polímeros y copolímeros para el recubrimiento de dispositivos médicos con un agente. Los ejemplos de implantes incluyen, pero no se limitan a, prótesis endovasculares, prótesis endovasculares eluyentes de fármaco, suturas, prótesis, catéteres vasculares, catéteres de diálisis, injertos vasculares, válvulas protésicas del corazón, marcapasos, desfibriladores cardioversores implantables, agujas IV, dispositivos para el ajuste y la formación de huesos, tales como pernos, tornillos, placas y otros dispositivos, y matrices de tejido artificial para la cicatrización.

Además de los métodos proporcionados en el presente documento, los oligómeros para su uso según la invención se pueden formular para administración en cualquier forma conveniente para su uso en medicina o veterinaria, por analogía con otros productos farmacéuticos. Los oligómeros antisentido y sus formulaciones correspondientes se pueden administrar solos o en combinación con otras estrategias terapéuticas en el tratamiento de inflamación.

Según la invención, las vías de administración de oligómeros antisentido incluyen, pero no se limitan a, diversas vías

sistémicas, que incluyen vías orales y parenterales, por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular, así como inhalación, transdérmica, pulmonar y tópica. La vía apropiada se puede determinar por un experto en la técnica, según convenga a la afección del sujeto en tratamiento. Por ejemplo, una vía apropiada para la administración de un oligómero antisentido en el tratamiento de una afección de la piel puede incluir administración tópica, mientras que la administración de un oligómero antisentido para el tratamiento de una afección respiratoria (por ejemplo, EPOC) puede incluir administración por inhalación, intranasal o pulmonar. El oligómero también se puede administrar directamente al sitio de la infección inflamatoria, o a la circulación sanguínea.

El oligómero antisentido se puede administrar en cualquier vehículo conveniente que sea fisiológicamente aceptable. Dicha composición puede incluir cualquiera de una variedad de vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales empleados por los expertos habituales en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), agua, etanol acuoso, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua o emulsiones de triglicéridos, comprimidos y cápsulas. La elección del vehículo fisiológicamente aceptable adecuado variará dependiendo del modo de administración elegido.

En algunos casos, como se observa anteriormente, los liposomas se pueden emplear para facilitar la captación del oligonucleótido antisentido en células (véase, por ejemplo, Williams, S.A., *Leukemia* 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., *Antiviral Res.* 23:119, 1994; Uhlmann et al., *antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle*, *Chemical Reviews*, Volumen 90, No. 4, páginas 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Capítulo 14, *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp. 287-341, Academic Press, 1979). Los hidrogeles también se pueden usar como vehículos para la administración de oligómeros antisentido, por ejemplo, como se describe en los documentos de patente WO 93/01286 o WO1993/001286 A2. Alternativamente, los oligonucleótidos se pueden administrar en microesferas o micropartículas (véase, por ejemplo, Wu, G.Y. y Wu, C.H., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432, 1987). Alternativamente, el uso de microburbujas rellenas de gas complejadas con los oligómeros antisentido puede potenciar la administración a tejidos diana, como se describen en la patente de EE. UU. Nº 6.245.747.

También se pueden usar composiciones de liberación sostenida. Estas pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados tales como películas o microcápsulas.

En un aspecto del método, el sujeto es un sujeto humano, por ejemplo, un paciente diagnosticado con una afección inflamatoria localizada o sistémica. La afección de un paciente también puede prescribir la administración profiláctica de un oligómero antisentido de la invención, por ejemplo, en el caso de un paciente que (1) está inmunodeprimido; (2) es víctima de quemaduras; (3) tiene una sonda permanente; o (4) está a punto de someterse a cirugía o se ha sometido recientemente. En una realización preferida, el oligómero es un oligómero de morfolino de fosfordiamidato, contenido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se administra por vía oral. En otra realización preferida, el oligómero es un oligómero de morfolino de fosfordiamidato, contenido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se administra por vía intravenosa (i.v.).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido se pueden administrar en una cantidad y modo eficaz para dar como resultado una concentración en sangre pico de oligómero antisentido al menos 200-400 nM. Normalmente, se administran una o más dosis de oligómero antisentido, en general, en intervalos regulares, durante un periodo de aproximadamente una a dos semanas. Las dosis preferidas para administración por vía oral son desde aproximadamente 1-100 mg de oligómero por 70 kg. En algunos casos, pueden ser necesarias dosis superiores a 100 mg de oligómero/paciente. Para administración i.v., las dosis preferidas son desde aproximadamente 1 mg hasta 500 mg de oligómero por 70 kg. El oligómero antisentido se puede administrar en intervalos regulares durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, diariamente durante dos semanas o menos. Sin embargo, en algunos casos, el oligómero se administra intermitentemente durante un periodo de tiempo más largo. La administración puede ir seguida por, o ser simultánea a, la administración de un antibiótico u otro tratamiento terapéutico. La pauta de tratamiento se puede ajustar (dosis, frecuencia, vía, etc.) como se indica, basándose en los resultados de inmunoensayos, otras pruebas bioquímicas y el examen fisiológico del sujeto en tratamiento.

#### *MODELO ANIMAL DE INFLAMACIÓN MEDIADA POR IL-17/IL-13*

En el presente documento se desvelan además modelos de ratón de inflamación mediada por IL-23/IL-17 en seres humanos, y afecciones asociadas de la misma. Se cree que la infección por el virus de la meningitis coriográfica linfocítica (LCMV) en la cepa de ratón FVB desencadena, específicamente, una afección por la respuesta inmunitaria patológica mediada por IL-23/IL-17. Los síntomas de esta afección patológica imitan estrechamente los síntomas de la fiebre hemorrágica viral (FHV) en seres humanos (véase la Tabla 3); sin embargo, no se cree que resulten directamente de la replicación viral, por ejemplo, destrucción de células virales. En su lugar, se cree que los síntomas de la fiebre hemorrágica resultan de una respuesta inmunitaria aberrante y patológica por los ratones FVB a la infección por LCMV. El acceso antisentido de IL-17 reduce significativamente estos síntomas, y demuestra la importancia de la vía de señalización de IL-17 en este modelo de enfermedad hemorrágica. Por tanto, se cree que este estado inmunitario disfuncional y patológico está mediado por la señalización de IL-17, y puede implicar además vías de señalización de IL-23/IL-17. De esta forma, el modelo de FVB/LCMV proporciona un valioso sistema para no solo investigar la FHV e identificar agentes terapéuticos útiles para tratar esa enfermedad y sus síntomas,

sino, en general, también para investigar las afecciones inflamatorias mediadas por IL-23/IL-17. Por ejemplo, debido a la afección inmunitaria mediada por IL-17 disfuncional experimentada por los ratones FVB infectados por LCMV, este modelo se pueden usar para identificar agentes terapéuticos para tratar una variedad de afecciones inflamatorias que se asocian con la señalización de IL-17 o IL-23/IL-17, incluso más allá del contexto de la infección viral, que incluye las afecciones descritas en el presente documento y conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Iwakura et al., *The Journal of Clinical Research*. 116:1218- 1222, 2006).

En el presente documento se desvelan además métodos de identificación de un compuesto o agente que modula la actividad de señalización de IL-17 y/o IL-23, que comprende (a) poner en contacto un ratón FVB infectado por el virus de la meningitis coriográfica linfocítica (LCMV) con un compuesto de prueba; (b) medir uno o más síntomas de la infección por LCMV, normalmente fiebre hemorrágica, en el ratón FVB, en donde una diferencia de uno o más síntomas en comparación con un ratón FVB no tratado o un valor predeterminado indica que el agente modula la señalización de IL-17 y/o IL-23, identificando así el compuesto que modula la actividad de señalización de IL-17 y/o IL-23. Las realizaciones específicas incluyen métodos de identificación de un compuesto para el tratamiento de una fiebre hemorrágica viral (FHV), que comprende (a) poner en contacto un ratón FVB infectado por LCMV con un compuesto de prueba; (b) medir uno o más síntomas de la fiebre hemorrágica en el ratón FVB, en donde una diferencia de uno o más síntomas de FHV en comparación con un ratón FVB no tratado o un valor predeterminado indica que el agente trata la FHV, identificando así un agente para el tratamiento de FHV viral.

En el presente documento también se desvelan modelos animales para identificar un agente que modula la actividad de señalización de IL-17 y/o IL-23, o para identificar un compuesto para el tratamiento de FHV, que comprende un ratón FVB infectado por LCMV, y un compuesto de prueba que modula la actividad de señalización de IL-17 y/o IL-23 y/o reduce la replicación de un virus que provoca FHV. Preferentemente, el ratón infectado desarrolla síntomas de fiebre hemorrágica después de la infección por LCMV, aunque la etapa de poner en contacto el ratón con el agente puede ocurrir antes o durante el desarrollo de dichos síntomas. Por consiguiente, ciertos compuestos de prueba o agentes, si se administran antes del desarrollo de los síntomas de la fiebre hemorrágica, pueden reducir o prevenir completamente uno o más de los síntomas del desarrollo en el ratón tratado.

Dependiendo del uso particular del modelo de ratón, los métodos se pueden poner en práctica midiendo y comparando una variedad de síntomas de la fiebre hemorrágica, para identificar un agente que modula la señalización de IL-17, señalización de IL-23 y/o reduce la replicación o carga viral de un virus que provoca FHV. Como se observa anteriormente, estos síntomas se pueden comparar cuantitativa o cualitativamente con un control apropiado, que incluye, por ejemplo, un ratón FVB infectado con LCMV pero sin tratar o tratado con vehículo solo (por ejemplo, un ratón infectado que no se ha expuesto a un compuesto de prueba), un ratón FVB infectado por LCMV que se ha expuesto a un control negativo (por ejemplo, un compuesto que se ha mostrado que tiene poco o ningún efecto sobre la señalización de IL-23/IL-17 y/o replicación viral), o uno o más valores predeterminados, entre otros controles adecuados. Los valores predeterminados se pueden identificar según técnicas rutinarias en la técnica, tales como midiendo u observando los diversos síntomas de hemorragia en una población de ratones FVB infectados por LCMV pero no tratados, y promediando las mediciones u observaciones. De esta forma, no se necesita utilizar ratones no tratados de control específicos en cada experimento de cribado.

Los ejemplos de síntomas específicos que se pueden observar o medir incluyen hemorragia cutánea, hemorragia de la mucosa, mareos, petequias hepáticas, choque hipovolémico, leucopenia, trombocitopenia, carga viral y muerte. También se pueden medir y comparar los síntomas relacionados con la función hepática y renal, que incluyen, por ejemplo, análisis bioquímico de la sangre para mostrar el aumento o la disminución en la fosfatasa alcalina, nitrógeno ureico en sangre, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y niveles de bilirrubina total. También se pueden usar perfiles de hemograma completo para identificar agentes que modulan la señalización de IL-23/IL-17, y pueden incluir el aumento o la disminución en los recuentos de granulocitos y/o números de plaquetas (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1). También se pueden medir los niveles de citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias como indicadores o síntomas de fiebres hemorrágicas. Se incluyen IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17 e IFN $\alpha$ , entre otros descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. También se incluyen mediciones de carga viral. La práctica de la presente invención, sin embargo, no se limita a medir y comparar estos síntomas a modo de ejemplo, debido a que será rápidamente evidente para el experto que se pueden usar otras mediciones y observaciones referentes a este modelo animal de disfunción inmunitaria mediada por IL-23/IL-17 para identificar agentes o compuestos que alteran ese estado inmunitario patológico. Los métodos para evaluar cualitativa o cuantitativamente los síntomas de fiebre hemorrágica, tales como inflamación, se describen en el presente documento y son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ejemplos 1 y 2).

Se desvela además en el presente documento que la diferencia en el valor de uno o más síntomas de una prueba animal en comparación con un animal de control o un valor predeterminado puede ser estadísticamente significativa. Un resultado o diferencia normalmente se denomina estadísticamente significativo si es poco probable que haya ocurrido por casualidad. El nivel de significancia de una prueba o resultado se refiere tradicionalmente a un concepto de prueba estadística de hipótesis frecuentista. En casos simples, la significación estadística se puede definir como la probabilidad de tomar una decisión para rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es en realidad verdadera (una decisión conocida como un error de tipo I, o "determinación de positivo falso"). Esta decisión se hace frecuentemente usando el valor de  $p$ : si el valor de  $p$  es inferior al nivel de significancia, entonces se rechaza la hipótesis nula. Cuanto más pequeño sea el valor de  $p$ , más significativo es el resultado. También se pueden utilizar

factores de Bayes para determinar la significación estadística (véase, por ejemplo, Goodman S., Ann Intern Med 130:1005-13, 1999).

5 En casos más complicados, pero prácticamente importantes, el nivel de significancia de una prueba o resultado puede reflejar un análisis en el que la probabilidad de tomar una decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es en realidad verdadera no es superior a la probabilidad establecida. Este tipo de análisis permite que las aplicaciones en las que la probabilidad de decidir si se rechazan pueda ser mucho más pequeña que el nivel de significancia de algunos conjuntos de suposiciones englobadas dentro de la hipótesis nula.

10 Se desvela además en el presente documento que una diferencia estadísticamente significativa puede incluir situaciones en donde la medición de un síntoma proporciona al menos aproximadamente 1,2X, 1,3X, 1,4X, 1,5X, 1,6X, 1,7X, 1,8X, 1,9X, 2,0X., 2,2X, 2,4X, 2,6X, 2,8X, 3,0X, 4,0X, 5,0X, 6,0X, 7,0X, 8,0X, 9,0X, 10,0X, 15,0X, 20,0X, 50,0X, 100,0X o mayor diferencia en un animal tratado (es decir, el animal tratado con el compuesto de prueba) en comparación con un control apropiado o un valor predeterminado, que incluye todos los números enteros y puntos intermedios decimales (por ejemplo, 1,24X, 1,25X, 2,1X, 2,5X, 60,0X, 75,0X, etc.). En ciertas realizaciones, una diferencia estadísticamente significativa puede incluir situaciones en las que una diferencia en uno o más síntomas proporciona al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 por ciento (%) o mayor diferencia en un animal tratado en comparación con un control apropiado, que incluye todos los números enteros y puntos intermedios decimales.

25 Como ejemplo adicional, también se puede determinar una diferencia estadísticamente significativa realizando la prueba de la Z, es decir, calculando una puntuación de Z absoluta, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica (véase el Ejemplo 1). La prueba de la Z se utiliza normalmente para identificar diferencias significativas entre una media de muestra y una media de población. Por ejemplo, en comparación con una tabla normal estándar (por ejemplo, un tejido de control), en un intervalo de confianza del 95 % (es decir, al nivel de significancia del 5 %), una puntuación de Z con un valor absoluto superior a 1,96 indica no aleatoriedad. Para un intervalo de confianza de 99 %, si el Z absoluto es mayor que 2,58, significa que  $p < 0,01$ , y la diferencia es incluso más significativa – se puede rechazar la hipótesis nula con mayor confianza. En estas realizaciones y realizaciones relacionadas, una puntuación de Z absoluta de 1,96, 2, 2,58, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, que incluye todos los puntos intermedios decimales (por ejemplo, 10,1, 10,6, 11,2, etc.), puede proporcionar una fuerte medida de la significación estadística. En ciertas realizaciones, una puntuación de Z absoluta superior a 6 puede proporcionar significación estadística excepcionalmente alta.

35 Similitud sustancial se refiere, en general, a la ausencia de una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión entre el animal tratado y el control de referencia o valor predeterminado. Los ejemplos de similitud sustancial pueden incluir situaciones en las que el tratamiento proporciona una diferencia de menos de aproximadamente 0,05X, 0,1X, 0,2X, 0,3X, 0,4X, 0,5X, 0,6X, 0,7X, 0,8X, 0,9X, 1,0X, 1,1X, 1,2X, 1,3X o 1,4X en los síntomas en el animal tratado en comparación con un control apropiado, que incluye todos los puntos intermedios decimales (por ejemplo, 15X, 0,25X, 0,35X, etc.).

45 Los modelos animales y los métodos como se desvela en el presente documento se pueden usar para evaluar una variedad de compuestos de prueba o agentes de prueba para su capacidad para modular la señalización mediada por IL-23/IL-17, o reducir la replicación de virus que provoca fiebre hemorrágica viral. Los ejemplos de dichos compuestos de prueba incluyen oligonucleótidos antisentido, agentes de iARN, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, así como otros ligantes, tales como receptores solubles, adnectinas, péptidos, miméticos de péptido, moléculas pequeñas, aptámeros y otros descritos en el presente documento y conocidos en el arte terapéutico. Los agentes antisentido y de iARN se describen en cualquier parte en el presente documento.

50 Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales, anticuerpo de un solo dominio (sdAbs o "nanocuerpos"), moléculas de anticuerpo "humanizado", "FR inactivados" y "FR recombinantemente inactivados", entre otras moléculas basadas en anticuerpos conocidas en la técnica.

55 El término "péptido" se refiere normalmente a un polímero de restos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos del mismo. En ciertas realizaciones, el término "péptido" se refiere a polipéptidos relativamente cortos, que incluyen péptidos que consisten en aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos, que incluyen todos los números enteros e intervalos (por ejemplo, 5-10, 8-12, 10-15) intermedios. Los péptidos se pueden componer de aminoácidos que existen de forma natural y/o aminoácidos que no existen de forma natural, como se describe en el presente documento (véase, por ejemplo, SEQ ID NOS: 15-32).

65 Además de los péptidos que consisten solo en aminoácidos que existen de forma natural, también se proporcionan peptidomiméticos o análogos de péptido. Los análogos de péptido se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se llaman "miméticos de péptido" o "peptidomiméticos" (Luthman, et al., A Textbook of Drug Design and

Development, 14:386-406, 2ª Ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:1699-1720 (1994); Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber y Freidinger TINS, p. 392 (1985); y Evans, et al., J. Med. Chem. 30:229 (1987)). Un peptidomimético es una molécula que imita la actividad biológica de un péptido pero ya no es peptídico en la naturaleza química. Se conocen en la técnica compuestos peptidomiméticos y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N° 6.245.886.

En el presente documento se desvelan además peptoides como compuestos de prueba. Los derivados de peptoides como se desvela en el presente documento representan otra forma de péptidos modificados que retienen importantes determinantes estructurales para actividad biológica, sin embargo eliminan los enlaces peptídicos, confiriendo así resistencia a la proteólisis (Simon, et al., PNAS USA. 89:9367-9371, 1992). Los peptoides son oligómeros de glicinas N-sustituidas. Se han descrito varios grupos N-alquilo, cada uno correspondiente a la cadena lateral de un aminoácido natural. Los peptidomiméticos de la presente invención incluyen compuestos en los que al menos un aminoácido, algunos aminoácidos o todos los restos de aminoácidos están sustituidos por las glicinas N-sustituidas correspondientes. Se describen bibliotecas de peptoides, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N° 5.811.387.

Los aptámeros también están incluidos como compuestos de prueba (véase, por ejemplo, Ellington et al., Nature. 346, 818-22, 1990; y Tuerk et al., Science. 249, 505-10, 1990). Los ejemplos de aptámeros incluyeron aptámeros de ácido nucleico (por ejemplo, aptámeros de ADN, aptámeros de ARN) y aptámeros peptídicos. Los aptámeros de ácido nucleico se refieren, en general, a especies de ácido nucleico que se han manipulado mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o método equivalente, tal como SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), para unirse a diversas dianas moleculares tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, e incluso células, tejidos y organismos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 6.376.190; y 6.387.620).

Los aptámeros peptídicos normalmente incluyen un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un armazón de proteína, una limitación estructural doble que normalmente aumenta la afinidad de unión del aptámero peptídico hasta niveles comparables a los de un anticuerpo (por ejemplo, en el intervalo nanomolar). En ciertas realizaciones, la longitud del bucle variable se puede componer de aproximadamente 10-20 aminoácidos (incluyendo todos los números enteros intermedios), y el armazón puede incluir cualquier proteína que tenga buena solubilidad y propiedades de compacidad. Ciertas realizaciones a modo de ejemplo pueden utilizar la proteína bacteriana tiorredoxina-A como proteína de armazón, siendo el bucle variable insertado dentro del sitio activo reductor (bucle -Cys-Gly-Pro-Cys- [SEQ ID NO: 36] en la proteína natural), siendo las dos cadenas laterales de las cisteínas capaces de formar un puente disulfuro. Los métodos de identificación de aptámeros peptídicos se describen, por ejemplo, en la solicitud de EE. UU. N° 2003/0108532. La selección de aptámeros peptídicos se puede realizar usando diferentes sistemas conocidos en la técnica, que incluyen el sistema de dos híbridos de levadura.

También se incluyen como compuestos de prueba las adnectinas™, avímeros™ y anticalinas. Las adnectinas™ se refieren a una clase de productos biológicos dirigidos derivados de fibronectina humana, una proteína extracelular abundante que se une naturalmente a otras proteínas. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de EE. UU. N° 2007/0082365; 2008/0139791; y 2008/0220049. Las adnectinas™ consisten normalmente en un esqueleto de fibronectina natural, así como los múltiples dominios de direccionamiento de una porción específica de fibronectina humana. Los dominios de direccionamiento se pueden manipular para permitir que una Adnectina™ reconozca específicamente una diana terapéutica de interés.

Avímeros™ se refieren a proteínas de unión multiméricas o péptidos manipulados usando barajado de exones *in vitro* y presentación en fagos. Se unen múltiples dominios de unión, dando como resultado mayor afinidad y especificidad en comparación con los dominios de inmunoglobulina de epítopo individual. Véase, por ejemplo, Silverman et al., Nature Biotechnology. 23:1556-1561, 2005; patente de EE. UU. N° 7.166.697; y las solicitudes de EE. UU. N° 2004/0175756, 2005/0048512, 2005/0053973, 2005/0089932 y 2005/0221384.

También se incluyen como compuestos de prueba las proteínas de repetición de alquirina diseñadas (DARPin), que incluyen una clase de proteínas no de inmunoglobulina que pueden ofrecer ventajas con respecto a los anticuerpos para la unión a diana en el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de fármacos. Entre otros usos, las DARPinas son idealmente aptas para la obtención de imágenes *in vivo* o la administración de toxinas u otras cargas terapéuticas debido a sus propiedades moleculares favorables, que incluyen tamaño pequeño y alta estabilidad. La producción de bajo coste en las bacterias y la rápida generación de muchas DARPinas específicas de diana hace que el enfoque de las DARPinas sea útil para el descubrimiento de fármacos. Además, las DARPinas pueden ser fácilmente generadas en formatos multiespecíficos, que ofrecen la posibilidad de elegir como diana una DARPina efectora para un órgano específico o para múltiples receptores diana con una molécula compuesta de varias DARPinas. Véase, por ejemplo, Stumpp et al., Curr Opin Drug Discov Devel. 10:153-159, 2007; solicitud de EE. UU. N° 2009/0082274; y WO02/20565A2.

Ciertas realizaciones incluyen "monocuerpos" como compuestos de prueba, que normalmente utilizan el 10º dominio de tipo III de fibronectina de fibronectina humana (FNfn10) como armazón para presentar múltiples bucles de superficie para la unión de diana. FNfn10 es una proteína pequeña (94 restos) con una estructura de sándwich  $\beta$

similar al pliegue de la inmunoglobulina. Es altamente estable sin enlaces disulfuro o iones metálicos, y se puede expresar en la forma correctamente plegada a un alto nivel en bacterias. El armazón de FNfnIO es compatible con prácticamente cualquier tecnología de presentación. Véase, por ejemplo, Batori et al., *Protein Eng.* 15:1015-20, 2002; y Wojcik et al., *Nat Struct Mol Biol.*, 2010; y la patente de EE. UU. N° 6.673.901.

Anticalinas se refiere a una clase de miméticos de anticuerpos, que normalmente se sintetizan a partir de lipocalinas humanas, una familia de proteínas de unión con una región de bucle hipervariable soportada por una región estructural estructuralmente rígida. Véase, por ejemplo, la solicitud de EE. UU. N° 2006/0058510. Las anticalinas tienen normalmente un tamaño de aproximadamente 20 kDa. Las anticalinas se pueden caracterizar por una estructura de barril formada por ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas (un armazón de barril  $\beta$  estable) que se conectan por parejas por cuatro bucles peptídicos y una hélice  $\alpha$  unida. En ciertos aspectos, se hacen desviaciones conformacionales para lograr la unión específica en la(s) región (regiones) hipervariable(s) de bucle. Véase, por ejemplo, Skerra, *FEBS J.* 275:2677-83, 2008.

Un compuesto de prueba también puede incluir una o más moléculas pequeñas. Una "molécula pequeña" se refiere a un compuesto orgánico que es de origen sintético o biológico (biomolécula), pero normalmente no es un polímero. Los compuestos orgánicos se refieren a una gran clase de compuestos químicos cuyas moléculas contienen carbono, que normalmente excluyen los que contienen solo carbonatos, óxidos de carbono simple o cianuros. Una "biomolécula" se refiere, en general, a una molécula orgánica que se produce por un organismo vivo, que incluye moléculas poliméricas grandes (biopolímeros) tales como péptidos, polisacáridos y ácidos nucleicos también, y moléculas pequeñas tales como metabolitos secundarios primarios, lípidos, fosfolípidos, glucolípidos, esteroides, glicerolípidos, vitaminas y hormonas. Un "polímero" se refiere, en general, a una gran molécula o macromolécula compuesta de unidades estructurales de repetición, que normalmente están conectadas por enlace químico covalente.

Se desvela además en el presente documento que una molécula pequeña tiene un peso molecular inferior a 1000-2000 dáltones, normalmente entre aproximadamente 300 y 700 dáltones, y que incluye aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o 2000 dáltones.

Se conocen en la técnica bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas de moléculas pequeñas, tales como extractos fúngicos, bacterianos o de algas, y se pueden cribar con cualquiera de los modelos de ratón de la invención. Los ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en: (Carell et al., 1994a; Carell et al., 1994b; Cho et al., 1993; DeWitt et al., 1993; Gallop et al., 1994; Zuckermann et al., 1994).

En el presente documento se desvelan además diferentes bibliotecas para la identificación de moduladores de molécula pequeña de uno o más de señalización de IL-17, señalización de IL-23 y/o replicación de virus que provocan fiebre hemorrágica. Las bibliotecas útiles para los fines que se describen en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, (1) bibliotecas químicas, (2) bibliotecas de productos naturales y (3) bibliotecas combinatorias que comprenden péptidos aleatorios, oligonucleótidos y/o moléculas orgánicas.

Las bibliotecas químicas consisten en análogos estructurales de compuestos conocidos o compuestos que se identifican como "aciertos" o "cabezas de serie" por cribado de productos naturales. Las bibliotecas de productos naturales pueden derivar de conjuntos de microorganismos, animales, plantas u organismos marinos que se usan para crear mezclas para cribar por: (1) fermentación y extracción de caldos de microorganismos de la tierra, vegetales o marinos o (2) extracción de plantas u organismos marinos. Las bibliotecas de productos naturales incluyen policétidos, péptidos no ribosómicos y variantes (que no existen de forma natural) de los mismos. Véase, por ejemplo, Cane et al., *Science* 282:63-68, 1998. Las bibliotecas combinatorias pueden estar compuestas de grandes números de péptidos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos como una mezcla. Son relativamente fáciles de preparar por métodos de síntesis automáticos tradicionales, PCR, clonación o métodos de síntesis patentados.

Más específicamente, una biblioteca química combinatoria es un conjunto de diversos compuestos químicos generados o por síntesis química o síntesis biológica, combinando varios "elementos estructurales" químicos tal como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal tal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando un conjunto de elementos químicos estructurales (aminoácidos) en cada forma posible para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto de polipéptido). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos mediante dicha mezcla combinatoria de elementos químicos estructurales.

Para una revisión de química combinatoria y bibliotecas creadas a partir de ella, véanse, por ejemplo, Huc, I. y Nguyen, R. (2001) *Comb. Chem. High Throughput Screen* 4:53-74; Lepre, C A. (2001) *Drug Discov. Today* 6:133-140; Peng, S. X. (2000) *Biomed. Chromatogr.* 14:430-441; Bohm, H. J. and Stahl, M. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:283-286; Barnes, C y Balasubramanian, S. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:346-350; Lepre, Enjalbal, C, et al., (2000) *Mass Septrom Rev.* 19:139-161; Hall, D. G., (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:262-262; Lazo, J. S., y Wipf, P. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293:705-709; Houghten, R. A., (2000) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:273-282; Kobayashi, S. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2000) 4:338-345; Kopylov, A. M. y Spiridonova, V. A. (2000) *Mol. Biol. (Mosk)* 34:1097-1113; Weber, L. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:295-302; Dolle, R. E. (2000) *J. Comb. Chem.*

2:383-433; Floyd, C D., et al., (1999) Prog. Med. Chem. 36:91-168; Kundu, B., et al., (1999) Prog. Drug Res. 53:89-156; Cabilly, S. (1999) Mol. Biotechnol. 12:143-148; Lowe, G. (1999) Nat. Prod. Rep. 16:641-651; Dolle, R. E. y Nelson, K. H. (1999) J. Comb. Chem. 1:235-282; Czarnick, A. W. y Keene, J. D. (1998) Curr. Biol. 8:R705-R707; Dolle, R. E. (1998) Mol. Divers. 4:233-256; Myers, P. L., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:701-707; y Pluckthun, A. y Cortese, R. (1997) Biol. Chem. 378:443.

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están comercialmente disponibles (véanse, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están ellas mismas comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Mo., ChemStar, Ltd., Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Biosciences, Columbia, Md., etc.).

Se desvela además en el presente documento que el compuesto de prueba se une específicamente a una cualquiera o más de IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-17RC y IL-23R. Se dice que un compuesto de prueba se "une específicamente" a una molécula diana seleccionada si reacciona a un nivel detectable (dentro de, por ejemplo, un ensayo de ELISA) con la molécula diana y no reacciona detectablemente en un modo estadísticamente significativo con moléculas no relacionadas en condiciones similares.

Se desvela además en el presente documento que el compuesto de prueba es un oligonucleótido antisentido que contiene entre 10-40 bases y una secuencia de acceso de al menos 10 bases contiguas complementaria a una secuencia diana, en donde la secuencia diana es un transcrito de pre-ARNm de una proteína seleccionada de IL-17, IL-23, IL-17RA, IL-17RC y IL-23R.

Como se observa anteriormente, los modelos animales y métodos relacionados se pueden usar no solo para estudiar los mecanismos fundamentales de la señalización de IL-23/IL-17, por ejemplo, para identificar otros jugadores celulares en estas vías, particularmente ya que ellos contribuyen a la disfunción inmunitaria, pero también para identificar uno cualquiera o más agentes o compuestos para tratar una variedad de enfermedades o afección asociada a la señalización de IL-17 y/o IL-23. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección que se va a tratar es fiebre hemorrágica viral, que se pueden provocar mediante una variedad de virus. Los ejemplos de dichos virus incluyen los de las familias virales Arenaviridae, Flaviviridae, Filoviridae, Togaviridae, Arteriviridae and Bunyaviridae. Los miembros específicos de estas familias virales se describen en cualquier parte en el presente documento y se conocen en la técnica.

Se desvela además en el presente documento que la enfermedad o afección es una enfermedad o afección inflamatoria, como se describe en cualquier parte en el presente documento y se conoce en la técnica, que incluye afecciones inflamatorias crónicas y agudas. Simplemente a modo de ejemplo no limitante, la enfermedad o afección inflamatoria puede incluir asma, asma alérgica, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, artritis, dermatitis atópica o psoriasis, endotoxemia, septicemia, síndrome del choque tóxico, enfermedad infecciosa, artritis reumatoide, enfermedad hepatoiliar, aterosclerosis, promoción del crecimiento tumoral, enfermedad articular degenerativa, enfermedad renal inmunomediada, enfermedad respiratoria en el adulto (ERA), choque séptico, insuficiencia multiorgánica, lesión pulmonar inflamatoria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipersensibilidad de las vías respiratorias, bronquitis crónica, asma alérgica, neumonía bacteriana, psoriasis, eccema, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, síndrome nefrótico, rechazo del aloinjerto de órgano, enfermedad injerto contra huésped (EICH), rechazo de trasplante de riñón, pulmón, corazón, etc., artritis inducida por la pared celular estreptocócica (PCE), osteoartritis, gingivitis/periodontitis, queratitis del estroma herpético, cánceres que incluyen de próstata, renal, colon, ovario, cervical, leucemia, angiogénesis, reestenosis y enfermedad de Kawasaki, entre otros. Los compuestos proporcionados en el presente documento, o identificados según los modelos animales de la presente divulgación, también se pueden usar para tratar una cualquiera o más de estas enfermedades o afecciones.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solo y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que se podrían cambiar o modificar para dar resultados esencialmente similares.

## Ejemplos

*Materiales y métodos.* Todos los péptidos se sintetizaron personalmente por Global Peptide Services (Ft. Collins, CO) o en AVI BioPharma (Corvallis, OR) y se purificaron hasta >90 % de pureza. Se sintetizaron oligómeros de morfolino de fosfordiamidato (PMO) en AVI BioPharma según métodos conocidos, como se describe, por ejemplo, en ((Summerton y Weller 1997) y la patente de EE. UU. N° 5.185.444 y se describieron adicionalmente en el documento de patente WO2009064471A1. Las estructuras a modo de ejemplo de PMO son como se muestran en las Figuras 1A-C.

Algunos de los oligómeros de PMO se conjugaron en el extremo 3' con uno de dos péptidos ricos en arginina ((RXRRBR)2XB o (RXR)4XB; SEQ ID NOs: 23 y 18, respectivamente) para formar PMO conjugados con péptido

(PPMO) para potenciar la captación celular como se describe (patente de EE. UU. N° 7.468.418, WO2009/005793A2 y (Marshall, Oda *et al.* 2007; Abes, Moulton *et al.* 2008)).

Una vía sintética que se puede usar para preparar subunidades de morfolino que contienen un enlace (1-piperazino) fosfinilidenoxi se describe en el documento de patente WO2008036127A2 y el detalle experimental adicional para una síntesis representativa se proporciona más adelante. La reacción de piperazina y cloruro de tritilo da tritilpiperazina, que se aisló como la sal de succinato. La reacción con trifluoroacetato de etilo en presencia de una base débil (tal como diisopropiletilamina o DIEA) proporcionó 1-trifluoroacetil-4-tritilpiperazina, que reaccionó inmediatamente con HCl para proporcionar la sal con buen rendimiento. La introducción del resto diclorofosforilo se realizó con oxiclorigenato de fósforo en tolueno.

Se hace reaccionar el cloruro de ácido con subunidades de morfolino (moN), que se puede preparar como se describe en la patente de EE. UU. N° 5.185.444 o en Summerton y Weller, 1997 (citado anteriormente) y se describe además en el documento de patente WO2009/064471A1, para proporcionar las subunidades activadas. Se usan grupos protectores adecuados para las bases de nucleósido, donde sea necesario; por ejemplo, benzoílo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina, y pivaloilmetilo para inosina. Las subunidades que contienen el enlace (1-piperazino) fosfinilidenoxi se pueden incorporar en el protocolo de síntesis de PMO existente, como se describe, por ejemplo, en Summerton y Weller (1997), sin modificación.

## EJEMPLO 1

### MODELO MURINO LETAL DE INFECCIÓN POR VIRUS HEMORRÁGICO

Para tratar la necesidad de modelos animales mejorados que repliquen la sintomatología de la enfermedad por el virus hemorrágico humano, se usaron diferentes acervos genéticos murinos en estudios de infección por arnavirus. Se infectaron ratones FVB y C57BL/6 (B6) por vía intravenosa con  $2 \times 10^6$  UFP del clon 13 del virus de la meningitis coriogénica linfocítica (LCMV-CI 13 o LCMV). Los ratones FVB y C57BL/6 infectados por LCMV-CI 13 mostraron una pérdida de peso similar, con la excepción del retraso en la aparición de pérdida de peso en la cepa FVB como se muestra en la Figura 7b. Los ratones FVB infectados por LCMV-CI 13 (n=18) murieron entre los seis y los nueve días después de la infección en comparación con los ratones C57BL/6 infectados por LCMV (n=10), que sobrevivieron todos como se muestra en la Figura 7a.

La investigación de los órganos internos mostró la hemorragia cutánea y de la mucosa de ratones FVB sin defectos obvios en ratones C57BL/6 como se muestra en la Figura 8. Los primeros síntomas hemorrágicos aparecieron en el día 6 después de la infección en ratones FVB. La Figura 8a muestra las Petequias epidérmicas en ratones FVB infectados por LCMV en el día 6 y la Figura 8b muestra la fuerte hemorragia en la región de las patas traseras de un animal muerto. La hemorragia cutánea que incluye el sangrado de los ojos, las uñas y los tejidos de la mucosa es un síntoma del virus de la fiebre hemorrágica clásica y se observó en el modelo de LCMV/FVB. También se observó una gran hemorragia de la mucosa de los intestinos y el hígado en los ratones infectados por FVB como se muestra en la Figura 8c. Los ratones intactos C57BL/6 y FVB infectados por LCMV no muestran estos síntomas como se muestra en las Figuras 8d y 8e.

Los ratones FVB llegaron a ser letárgicos y sensibles a la luz, tambaleándose frecuentemente cuando empezaron a moverse, mientras que los ratones C57BL/6 mantuvieron la energía normal y el comportamiento durante todo el experimento. La tensión arterial disminuyó enormemente en ratones FVB infectados en comparación con los ratones C57BL/6 infectados. Los perfiles del hemograma completo revelaron un aumento de los recuentos de granulocitos en ratones FVB infectados y una intensa reducción en los números de plaquetas como se muestra en la Figura 9. Los ratones C57BL/6 infectados mantuvieron los niveles normales de tanto granulocitos como plaquetas, también mostrados en la Figura 9. El análisis bioquímico de la sangre de ratones FVB infectados mostró elevados niveles de fosfatasa alcalina, nitrógeno ureico en sangre, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y bilirrubina total en comparación con ratones C57BL/6 infectados que demostraron la reducida función hepática y renal como se muestra en la Figura 9. Como se ha descrito anteriormente, la supervivencia de ratones FVB infectados por LCMV fue inferior a 10 % 9 días después de la infección, mientras que los ratones C57BL/6 mantuvieron 100 % de supervivencia hasta 20 días después de la infección. La carga viral en hígado, cerebro, bazo, riñón y pulmón fue más alta en ratones C57BL/6 infectados por LCMV que los ratones FVB infectados como se muestra en la Figura 10. La histología reveló la intensa necrosis esplénica, necrosis hepática y neumonía intersticial en ratones FVB. La aparición de hemorragia cutánea y de la mucosa, mareos, Petequias hepáticas, choque hipovolémico, muerte y trombocitopenia en ratones FVB repite muchos de los signos clínicos humanos de la enfermedad hemorrágica viral. Los ratones C57BL/6 infectados demostraron la enfermedad consuntiva bien caracterizada a partir de una infección crónica en curso, aunque no mostraron signos observables de enfermedad hemorrágica.

Esta observación y el aumento de carga viral en ratones C57BL/6 infectados en comparación con ratones FVB indica una respuesta específica de hospedador que inicia la enfermedad hemorrágica en vez de una enfermedad mediada por virus. Los datos demuestran un novedoso modelo para la investigación de enfermedad hemorrágica en ratones que repiten muchos de los síntomas clínicos humanos como se muestra a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de los síntomas de la enfermedad hemorrágica viral en seres humanos, cobayas y ratones FVB infectados por LCMV.

	Humano	cobaya	Ratón FVB
Hemorragia cutánea	+	desconocidos	+
Hemorragia de la mucosa	+	+	+
Mareos	+	+	+
Petequias hepáticas	+	-	+
Choque hipovolémico	+	+	+
Muerte	+	+	+
Leucopenia	+	desconocidos	+/-
Trombocitopenia	+	+	+

EJEMPLO 2

5 LOS OLIGÓMEROS ANTISENTIDO DIRIGIDOS A IL-17RC PREVIENEN LA MUERTE EN UN MODELO DE VIRUS HEMORRÁGICO LETAL

10 Se compraron ratones FVB/NCr macho de NCI-Frederick y se infectaron a las 8 semanas de edad con LCMV-CI 13 por vía intravenosa a  $1,0 \times 10^6$  UFP. Se trataron tres ratones con PPMO IL17RC-SD12 (secuencia: 5' CTGGACACAGAGGTTGG 3' (SEQ ID NO: 12) con P007 (SEQ ID NO:18) conjugada con el extremo 5') con 150 ug por vía intraperitoneal en el día 0, día 1 y día 2 después de la infección. Ocho ratones se trataron con PBS solo. Se observó una tendencia significativa de elevada supervivencia y número más bajo de copias de ARN viral con el tratamiento con IL17RC-SD12 como se muestra en la Figura 4B. La Figura 4A muestra que la supervivencia de los ratones tratados con IL17RC-SD12 aumentó hasta 66 % (2/3) en comparación con 12,5 % (1/8) de supervivencia en los controles tratados con PBS. El tratamiento con IL17RC-SD12 produjo una disminución de doble a cuádruple en los niveles de alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y bilirrubina total en sangre en comparación con los controles tratados con PBS, que indica la elevada función hepática y renal con el tratamiento con IL17RC-SD12 como se muestra en la Figura 5. La carga viral fue significativamente reducida en ratones tratados con IL17RC-SD12 en hígado, riñón, cerebro y pulmón en comparación con los controles de PBS como se muestra en la Figura 4. Además, se redujeron significativamente IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17 e IFN $\alpha$  en ratones FVB tratados con IL-17RC-SD12, infectados por LCMV CI 13, en comparación con ratones infectados por FVB no tratados como se muestra en la Figura 6.

25 La capacidad del compuesto antisentido de IL-17RC para modular las disfunción inmunitaria observada en los ratones FVB infectados por LCMV demuestra la importancia de la vía de señalización de IL-17 en este modelo de enfermedad hemorrágica. El modelo FVB/LCMV proporciona, por tanto, un valioso sistema para investigar otras estrategias para las intervenciones terapéuticas en la vía de señalización de IL-17 y IL-23.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

Secuencia (5' a 3')	Seq ID No
TCCCCACTGTCCAGCAGAGGGCCAGGCACATGCCCATGGAGGGGACCTGAGCAGACCCCCATTTCCCTTTCCAGGTGTGGCCTCTGGAACCTGACTCCGTTAGGACGAACATCTGCCCTTCAGGGAGGGTGAGCCGACCGGCCTGGGGCTGGGGTTGGGGTGTTCGAGCGATGGGTACCTGGCCTGCGGTGACTGTGCCCTTTCCCTTGCAGACCCCCGCGCACACCAGAACCTCTGGCAAGCCGCCGA CTGCAACTGCTGACCCTGCAGAGCTGGCTGCTGGACGCACCGTGCTCGCTGCCCGCAGAAGCGGCACTGTGCTGGCGGGCTCCGGGTGGGGACCCCTGCCAGCCACTGGTCCCACCGCTTTCCCTGGGAGAACGTCACCTGTGGACGTAAGTGAAGCAGAGGGCACCTCCCCTGGTGAGGGGAGAGTGGGGAACCGGGGGTCCCTTTTGTGATCCCACCCATTCCTCTCTTTCCACAGAAGGTTCTCGAGTTCCCATTGCTGAAAGGCCACCCTAACCTCTGTGTTTCAGGTCAGAAAGGGGTGCATAGTGCTGGGCTGGAGGCTGGACCTGGGCAGACCCCCAGCCAAGGGGTCTTAGTT	1
CACCCTCCCTGAAGGGGCAGATGT	2
AGAGGTTCTGGTGTGCGCGGGGT	3
TCCCACCCGGAGCCCGCCAGCAC	4

(continuación)

Secuencia (5' a 3')	Seq ID No
GTCCACAGTGACGTTCTCCCAGGA	5
CTGCTTCACTTACGTCCACAGTGA	6
ACTCGAGAACCTTCTGTGGAAAGA	7
CTGAACACAGAGGTTAGGGTGGCC	8
ATGCACCCCTTTCTGACCTGAACA	9
CCAGCCCAGCACTATGCACCCCTT	10
CTGAACACAGAGGTTAG	11
CTGGACACAGAGGTTGG	12
TCTGACCTGAACACAGAGGTTA	13
TCTGACCTGGACACAGAGGTTG	14
Transportadores de péptido rico en arginina	
RRRQRRKKRC	15
RRRRRRRRFFC	16
RAhxRAhxRAhxRAhxRB	17
RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	18
AhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	19
RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	20
RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	21
RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	22
RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	23
RRRRRRG	24
RRRRRRRG	25
RRRRRRRRG	26
RRRRRGRRRRG	27
RRRRFFRRRRG	28
RKKRRQRRRG	29
RRRQRRKKRG	30
RXRRGGRXRRGG	31
RXRRRXRXXRRXG	32

Referencias

5 Abes, R., H. M. Moulton, et al. (2008). "Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)<sub>4</sub> peptides: structure-activity studies." *Nucleic Acids Res.*

Carlson, M. J., M. L. West, et al. (2009). "In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations." *Blood* 113(6): 1365-74.

10 Egholm, M., O. Buchardt, et al. (1993). "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules." *Nature* 365(6446): 566-8.

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." *Mol Ther.*

15 Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126.

Moulton, H. M., M. H. Nelson, et al. (2004). "Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides." *Bioconjug Chem* 15(2): 290-9.

Rangachari, M., N. Mauermann, et al. (2006). "T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17." *J Exp Med* 203(8): 2009-19.

20 Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-95.

Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 14814-9.

25

# ES 2 816 898 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AVI BioPharma, Inc. Schnell, Frederick J. Iversen, Patrick L. Mourich, Dan V.

<120> MODULACIÓN ANTISENTIDO DE LA SEÑALIZACIÓN DE INTERLEUCINAS 17 y 23

5 <130> 120178.486PC

<140> PCT

<141> 13-05-2011

10 <150> US 61/334,516

<151> 13-05-2010

<160> 36

15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 611

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

tccccactgt ccagcagagg gccaggcaca tgcccatgga ggggacctga gcagaccccc 60
atctcctttc caggtgtggc ctctggaacc tgactccggt aggacgaaca tctgcccctt 120
cagggagggt gagccgaccg gcctggggct ggggttggg tggtgcgagc gatgggtacc 180
tggcctgceg tgactgtgcc ctttccttgc agacccccgc gcacaccaga acctctggca 240
agccgcccga ctgcaactgc tgaccctgca gagctggctg ctggacgcac cgtgctcgct 300
gcccgcagaa gcggcactgt gctggcgggc tccgggtggg gaccctgcc agccactggt 360
cccaccgctt tcctgggaga acgtcactgt ggacgtaagt gaagcagagg gcacctcccg 420
tggtgagggg agagtgggga accggggggt cccttttgtg atcccaccca ttctctctt 480
tccacagaag gttctcgagt tcccattgct gaaaggccac cctaacctct gtgttcaggt 540
cagaaagggg tgcatagtgc tgggctggag gctggacctg ggcagacccc ccagccaagg 600
gggtcttagt t
    
```

25 <210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón

<400> 2

35 caccctcct gaaggggcag atgt

24

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón

45 <400> 3

agaggttctg gtgtgcgcg gggt

24

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 816 898 T3

<223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 4  
 tccccaccg gagcccgcca gcac 24  
 5  
 <210> 5  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 5  
 gtccacagtg acgttctccc agga 24  
 15  
 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 6  
 ctgctcact tacgtccaca gtga 24  
 25  
 <210> 7  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 7  
 actcgagaac ctctgtgga aaga 24  
 35  
 <210> 8  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 8  
 ctgaacacag aggttagggt ggcc 24  
 45  
 <210> 9  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 9  
 atgcaccctt ctctgacctg aaca 24  
 60  
 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65  
 <220>

# ES 2 816 898 T3

<223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 10  
 ccagcccagc actatgcacc cctt 24  
 5  
 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 11  
 ctgaacacag aggttag 17  
 15  
 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 12  
 ctggacacag aggttgg 17  
 25  
 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 13  
 tctgacctga acacagaggt ta 22  
 35  
 <210> 14  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Secuencia de acceso antisentido para inducir el salto de exón  
 <400> 14  
 tctgacctgg acacagaggt tg 22  
 45  
 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Péptido que penetra en células  
 <400> 15  
 55  
 Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Cys  
 1 5 10  
 60  
 <210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT

ES 2 816 898 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido que penetra en células

5

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys  
1 5 10

10

<210> 17  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 3, 6, 9, 12  
<223> Acp

20

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 13  
<223> bAla

25

<400> 17

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa  
1 5 10

30

<210> 18  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

40

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 2, 5, 8, 11, 13  
<223> Acp

45

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 14  
<223> bAla

<400> 18

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa  
1 5 10

50

<210> 19  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

60

<220>  
<221> MOD\_RES

ES 2 816 898 T3

<222> 1, 4, 7, 10, 13  
 <223> Acp

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> 14  
 <223> bAla

10 <400> 19

**Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa**  
**1 5 10**

15 <210> 20  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido que penetra en células

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12  
 <223> Acp

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> 13  
 <223> bAla

<400> 20

**Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa**  
**1 5 10**

35 <210> 21  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido que penetra en células

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14  
 <223> Acp

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> 15  
 <223> bAla

<400> 21

**Arg Xaa Arg Xaa Xaa**  
**1 5 10 15**

55 <210> 22  
 <211> 17  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

5

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 2, 5, 8, 11, 14, 16  
<223> Acp

10

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 17  
<223> bAla

15

<400> 22

Arg Xaa Arg Xaa  
1 5 10 15  
Xaa

<210> 23  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

25

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 2, 8, 13  
<223> Acp

30

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 5, 11, 14  
<223> bAla

35

<400> 23

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa  
1 5 10

40

<210> 24  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

<400> 24

50

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly  
1 5

<210> 25  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

ES 2 816 898 T3

<400> 25

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly  
1 5

5

<210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly  
1 5

20

<210> 27  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

<400> 27

Arg Arg Arg Arg Arg Gly Arg Arg Arg Arg Gly  
1 5 10

30

<210> 28  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

<400> 28

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg Gly  
1 5 10

40

<210> 29  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Péptido que penetra en células

50

<400> 29

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly  
1 5 10

<210> 30

ES 2 816 898 T3

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Péptido que penetra en células

<400> 30

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly  
 1 5 10

10

<210> 31  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Péptido que penetra en células

20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> 2, 8  
 <223> Acp

25

<400> 31

Arg Xaa Arg Arg Gly Gly Arg Xaa Arg Arg Gly Gly  
 1 5 10

30

<210> 32  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Péptido que penetra en células

40

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> 2, 6, 8, 12  
 <223>Acp

<400> 32

Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Gly  
 1 5 10

45

<210> 33  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Péptido que penetra en células

55

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1, 3, 4, 7, 9, 10  
 <223> Xaa = Lisina, arginina o análogo de arginina

60

<220>  
 <221> VARIANTE

ES 2 816 898 T3

<222> 2, 8  
 <223> Xaa = un aminoácido neutro, -C(O)-(CHR)<sub>n</sub>-NH-, donde n es 2 a 7 y R es H o metilo

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 5, 6, 11, 12  
 <223> Xaa = alfa-aminoácido que tiene una cadena lateral de aralquilo neutra

10 <400> 33

Xaa  
 1 5 10

15 <210> 34  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido que penetra en células

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2, 6, 8, 12  
 <223> Xaa = Gly o Acp

<400> 34

Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa  
 1 5 10

30 <210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido que penetra en células

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3, 5, 9  
 <223> Xaa = Gly o Acp

<400> 35

Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa  
 1 5

45 <210> 36  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial

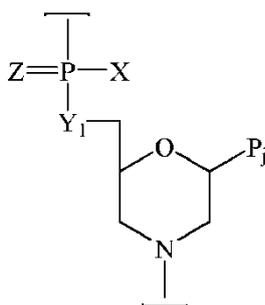
<220>  
 <223> Inserción de bucle peptídico sintético

55 <400> 36

Cys Gly Pro Cys  
 1

## REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* de modulación de la actividad de señalización de IL-17 en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un oligómero antisentido de morfolino de 10-40 bases que comprende una secuencia de al menos 10 bases contiguas de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS: 7-12, en donde el oligómero antisentido de morfolino induce el salto de exón completo o parcial de uno o más exones de un transcrito de pre-ARNm de IL-17RC, modulando así la actividad de señalización de IL-17 en la célula.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el oligómero antisentido de morfolino altera el corte y empalme de un transcrito de pre-ARNm de IL-17RC y aumenta la expresión de un IL-17RC de variante.
3. Un oligómero antisentido de morfolino de 10-40 bases que comprende una secuencia de al menos 10 bases contiguas de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS: 7-12, en donde el oligómero antisentido de morfolino induce el salto de exón completo o parcial de uno o más exones de un transcrito de pre-ARNm de IL-17RC.
4. El oligómero antisentido de morfolino de la reivindicación 3, en donde el oligómero antisentido de morfolino contiene aproximadamente 5 %-50 % de enlaces catiónicos de intersubunidad.
5. El oligómero antisentido de morfolino de la reivindicación 3, en donde el oligómero antisentido de morfolino comprende un péptido portador rico en arginina; opcionalmente en donde el péptido portador rico en arginina se une en su extremo C al extremo 5' o extremo 3' del oligómero antisentido de morfolino mediante un conector de uno o dos aminoácidos, opcionalmente en donde el conector es AhxβAla, en donde Ahx es ácido 6-aminohexanoico y βAla es β-alanina; o en donde el péptido portador rico en arginina se selecciona de SEQ ID NOS: 15-32.
6. El oligómero antisentido de morfolino de la reivindicación 3, en donde las unidades de morfolino en el oligómero se unen por enlaces de intersubunidad que contienen fósforo, según la estructura:



- en donde Z es S u O,  
 $X = NR^1R^2$  o  $OR^6$ ,  
 $Y_1 = O$  o  $NR^7$ ,  
 $P_j$  es un resto de apareamiento de bases de purina o pirimidina,  
 y cada dicho enlace se selecciona de:

- (a) enlace (a) no cargado, en donde cada uno de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^6$  y  $R^7$  se selecciona independientemente de hidrógeno y un alquilo C1 a C4, en donde cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  es opcionalmente metilo;  
 (b1) enlace (b1) catiónico, en donde  $X = NR^1R^2$  y  $Y = O$ , y  $NR^1R^2$  representa un grupo piperazino sustituido opcional, de forma que  $R^1R^2 = -CHRCHR(NR^3)(R^4)CHRCHR-$ , en donde

- cada  $R^4$  es H,  $CH_3$ , o un par de electrones, y  
 $R^3$  se selecciona de H, un alquilo C1 a C4,  $C(=NH)NH_2$ , Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> y  $[C(O)CHR'NH]_mH$ , en donde Z de Z-L-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que tiene enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino,  $R'$  es una cadena lateral de un aminoácido que existe de forma natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es 1 a 6, opcionalmente en donde:  
 cada R es H,  $R^4$  es H,  $CH_3$ , o un par de electrones, y  $R^3$  se selecciona de H,  $CH_3$ ,  $C(=NH)NH_2$  y  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ ;

- cada R es H,  $R^4$  es un par de electrones y  $R^3$  se selecciona de  $C(=NH)NH_2$  y  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ ;  
 al menos un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H,  $R^4$  es un par de electrones y  $R^3$  se selecciona de  $C(=NH)NH_2$  y  $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ ;  
 o al menos un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H, y cada uno de  $R^3$  y  $R^4$  es independientemente H o  $CH_3$ ,

(b2) enlace catiónico (b2), en donde  $X = NR^1R^2$  y  $Y = O$ ,  $R^1 = H$  o  $CH_3$ , y  $R^2 = LNR^3R^4R^5$ , en donde  $L$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se definen como antes, y  $R^5$  es H, un alquilo C1 a C4, o (alcoxi)alquilo inferior; y

(b3) enlace catiónico (b3), en donde  $Y = NR^7$  y  $X = OR^6$ , y  $R^7 = LNR^3R^4R^5$ , en donde  $L$ ,  $R$ , y  $R^4$  y  $R^5$  se definen como antes, y  $R^6$  es H o un alquilo C1 a C4; y al menos dicho enlace se selecciona de los enlaces catiónicos (b1), (b2), y (b3).

7. Un oligómero antisentido de morfolino de 10-40 bases que comprende una secuencia de acceso de al menos 10 bases contiguas de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS: 7-12, en donde el oligómero antisentido de morfolino induce el salto de exón completo o parcial de uno o más exones de un transcrito de pre-ARNm de IL-17RC, para su uso en un método de modulación de la inflamación en un sujeto que comprende administrar dicho oligómero antisentido de morfolino al sujeto, modulando así la inflamación en el sujeto.

8. El oligómero antisentido de morfolino para su uso de la reivindicación 7, comprendiendo el método:

(a) tratar fiebre hemorrágica viral (FHV);

(b) reducir una respuesta inflamatoria aguda, reducir una respuesta inflamatoria crónica, o ambas;

(d) modular la activación, secreción de moléculas inflamatorias, proliferación, actividad, migración o adhesión de una o más células inmunitarias o células vasculares;

(e) modular los niveles o la actividad de una o más moléculas inflamatorias;

(f) modular una respuesta inflamatoria o afección inflamatoria asociada a uno o más tejidos, sistemas de tejidos u órganos seleccionados de piel, folículos pilosos, sistema nervioso, sistema auditivo u órganos del equilibrio, aparato respiratorio, tejidos gastroesofágicos, sistema gastrointestinal, sistema vascular, hígado, vesícula biliar, sistema linfático/inmunitario, sistema urogenital, sistema musculoesquelético, tejido adiposo, mamas y sistema endocrino;

(g) tratar inflamación asociada a hipersensibilidad, una afección autoinflamatoria, cáncer, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o tormenta de citocinas;

(h) tratar inflamación asociada a una cualquiera o más de inflamación granulomatosa, inflamación fibrinosa, inflamación purulenta, inflamación serosa o inflamación ulcerativa;

(i) tratar inflamación asociada a una o más heridas; o

(j) tratar inflamación asociada a trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC).

9. El oligómero antisentido de morfolino para su uso de la reivindicación 8, en donde la FHV se provoca por un virus seleccionado de las familias virales Arenaviridae, Flaviviridae, Filoviridae, Togaviridae, Arteriviridae y Bunyaviridae.

10. El oligómero antisentido de morfolino para su uso de la reivindicación 8, en donde la una o más moléculas inflamatorias comprenden moléculas inflamatorias derivadas de plasma de uno cualquiera o más del sistema del complemento, sistema quinina, sistema de la coagulación o sistema de la fibrinólisis.

11. El oligómero antisentido de morfolino para su uso de la reivindicación 8, en donde la una o más moléculas inflamatorias comprenden moléculas inflamatorias obtenidas de célula de uno cualquiera o más de gránulos de lisosoma, aminas vasoactivas, eicosanoides, citocinas, proteínas de la fase aguda u óxido nítrico.

12. Una composición farmacéutica, que comprende un oligómero antisentido de morfolino de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

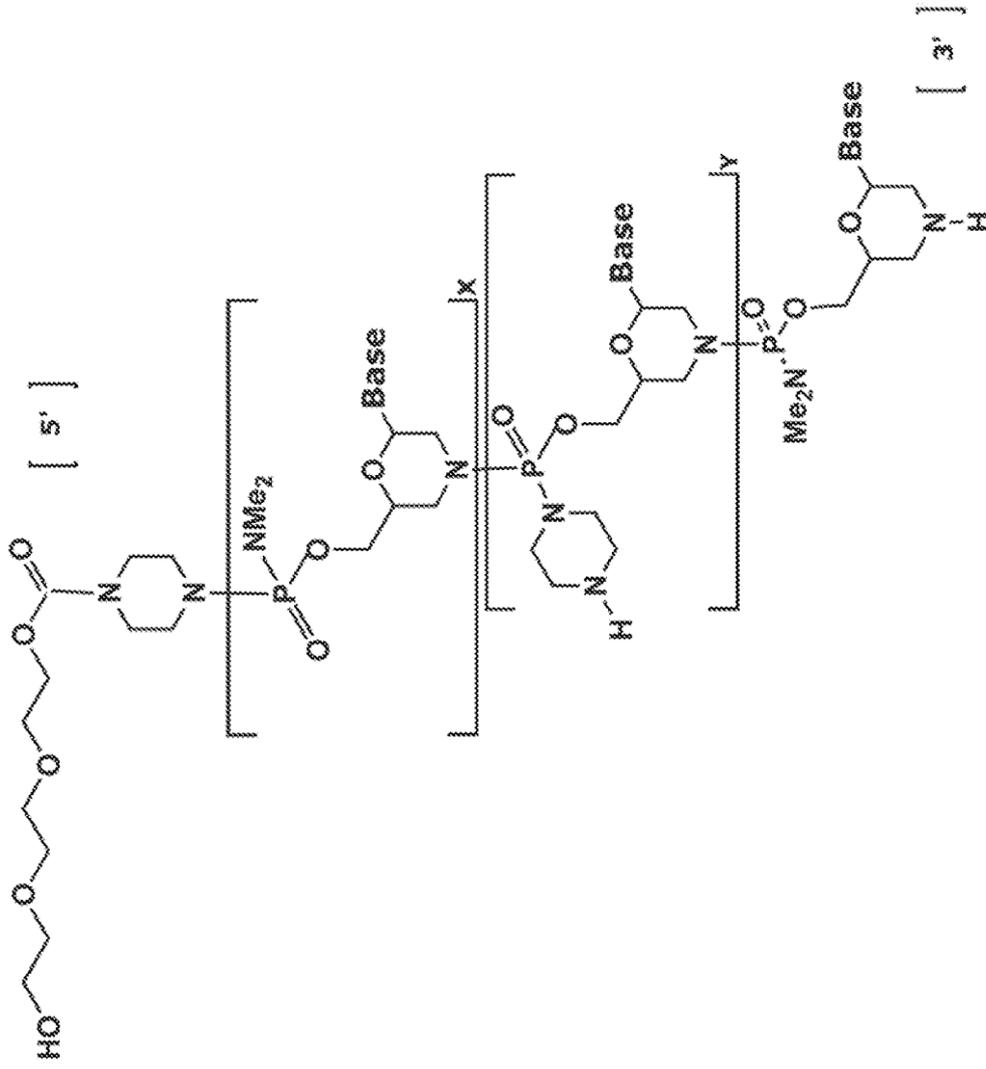


FIG. 1B

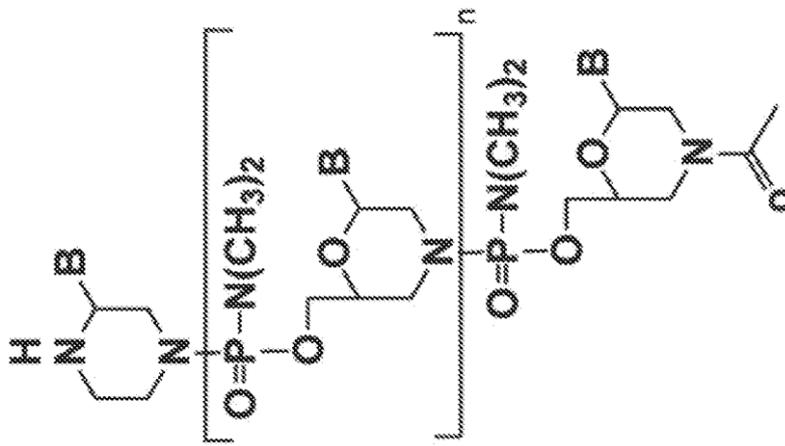


FIG. 1A



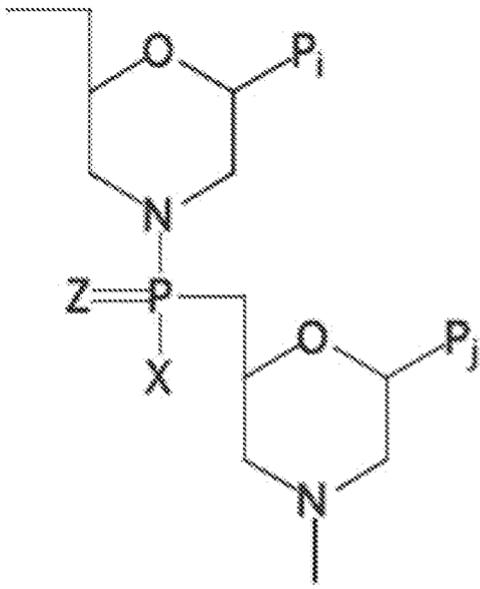


FIG. 1D

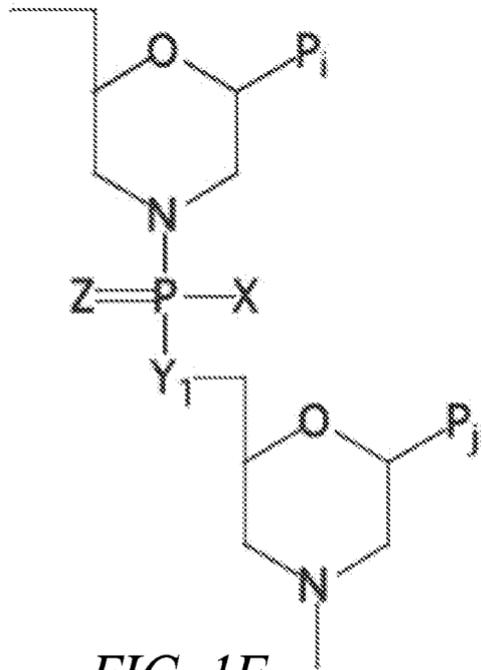


FIG. 1E

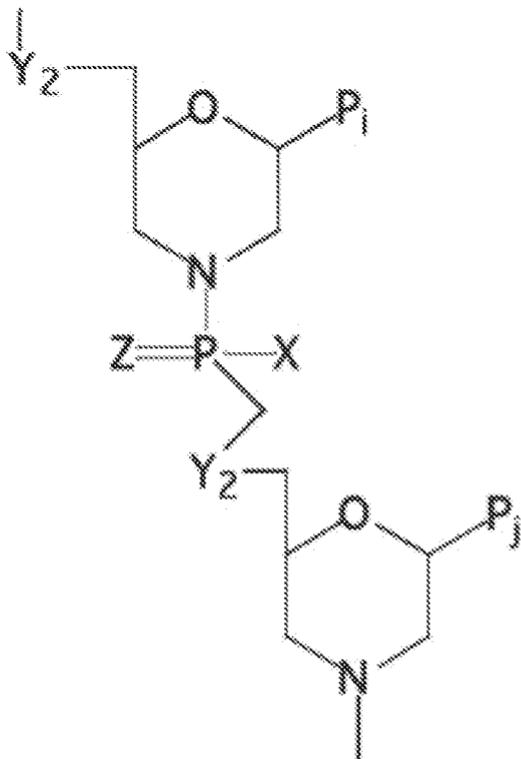


FIG. 1F

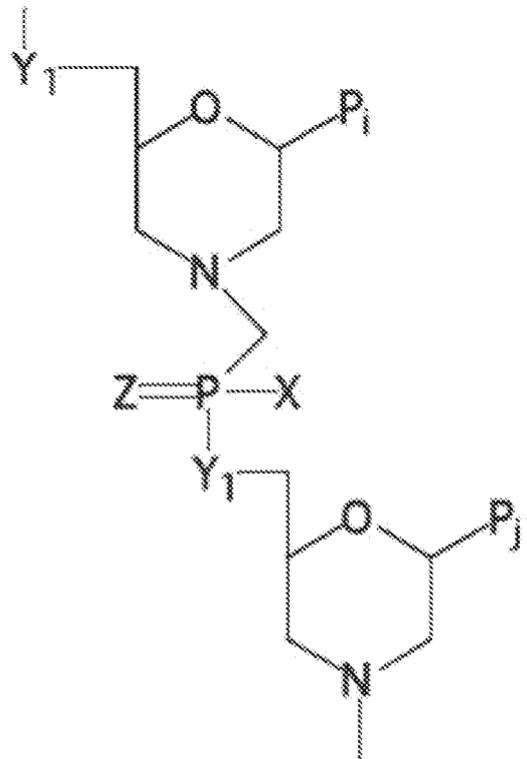
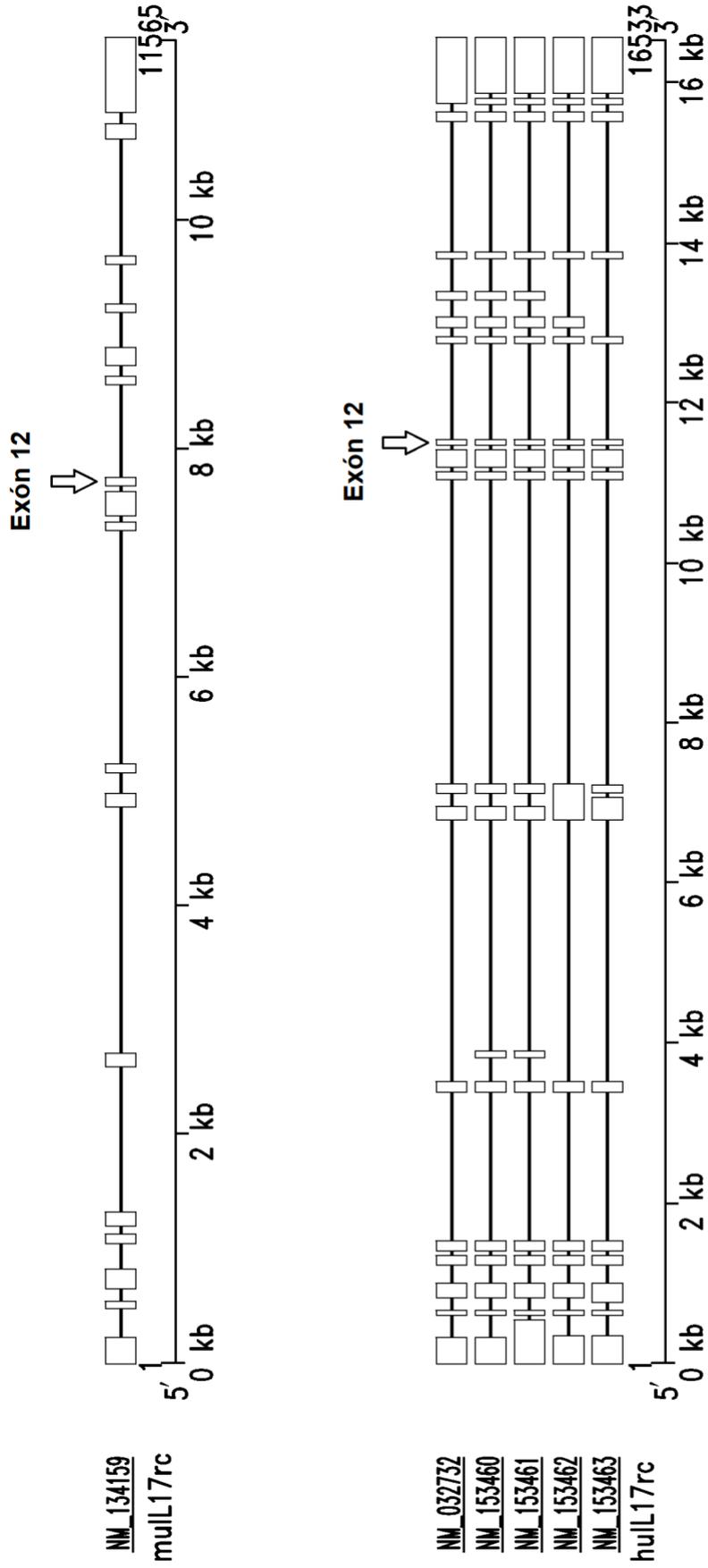


FIG. 1G



*FIG. 2*

Direccionamiento antisentido a modo de ejemplo de huLL-17RC

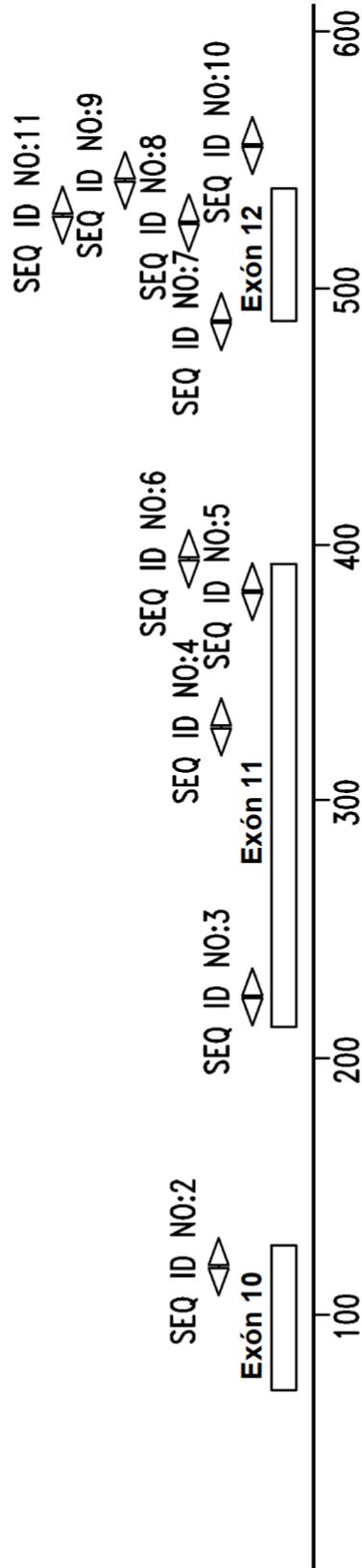


FIG. 3

Supervivencia de combinados: Proporciones de supervivencia

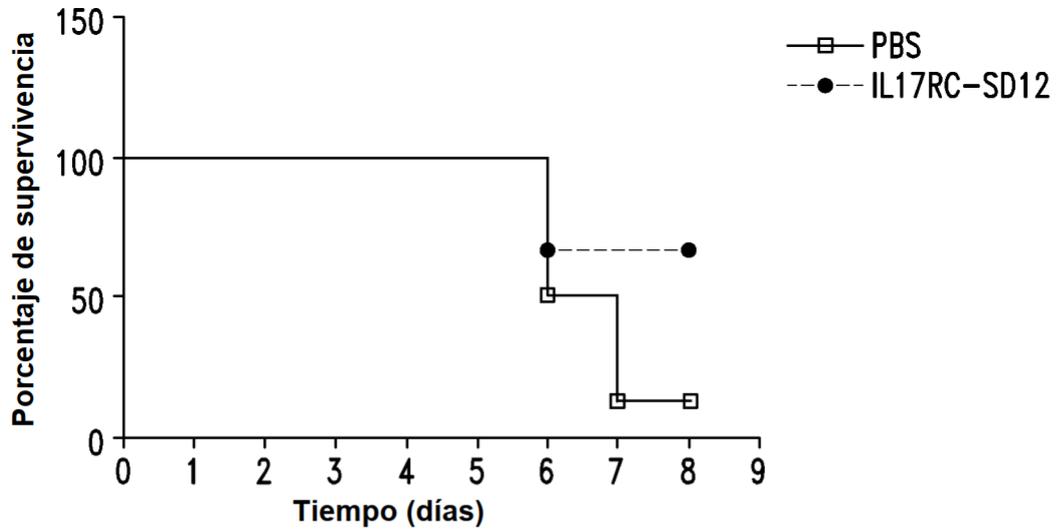
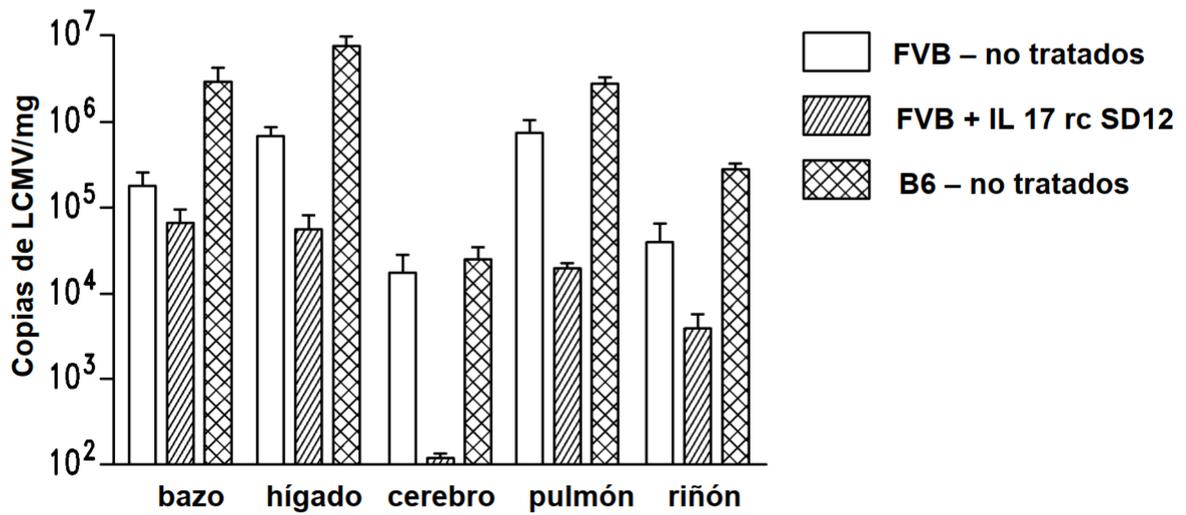


FIG. 4A



IL17RC-SD12 es SEQ: 12 conjugada con SEQ ID NO: 18

FIG. 4B

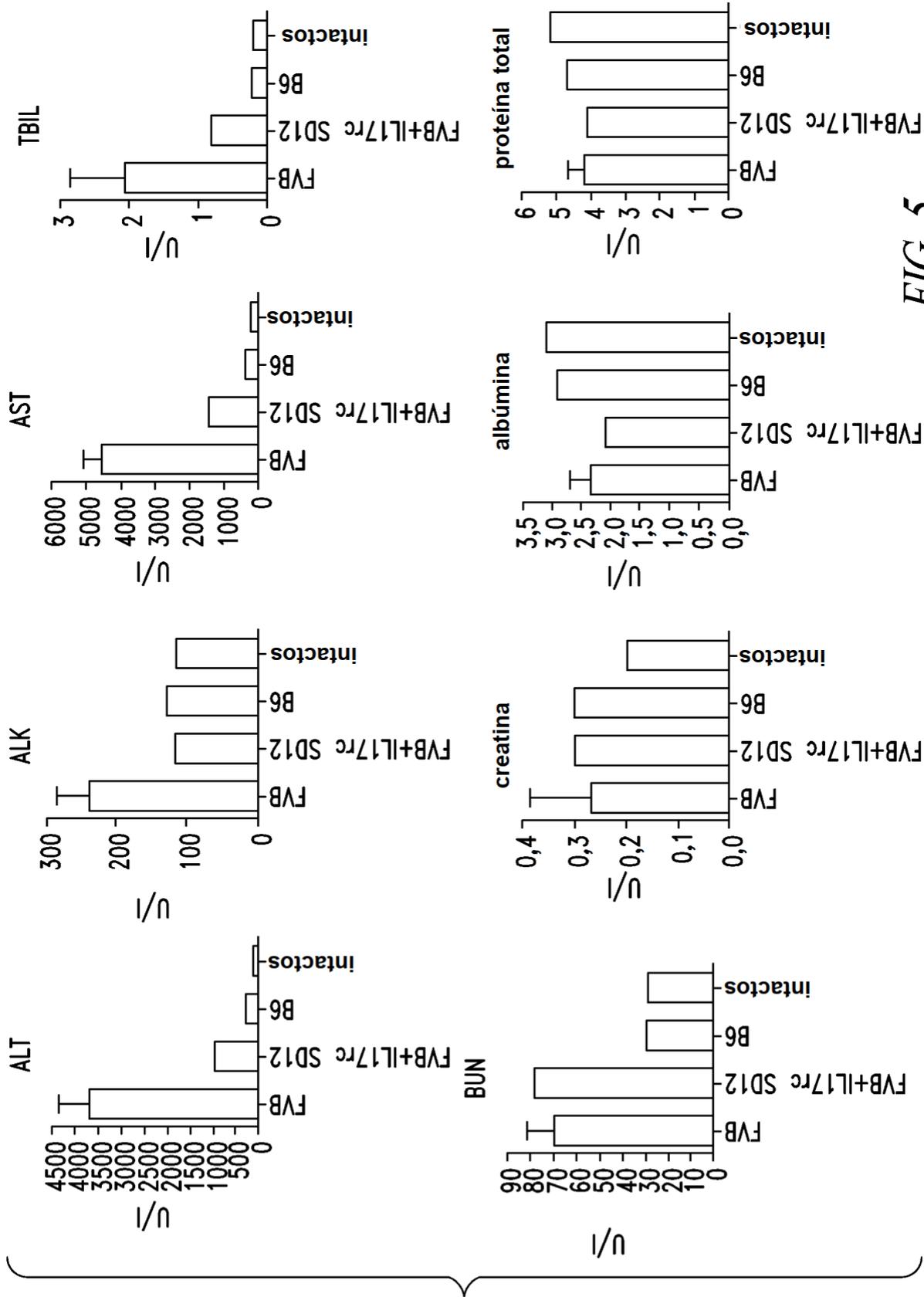
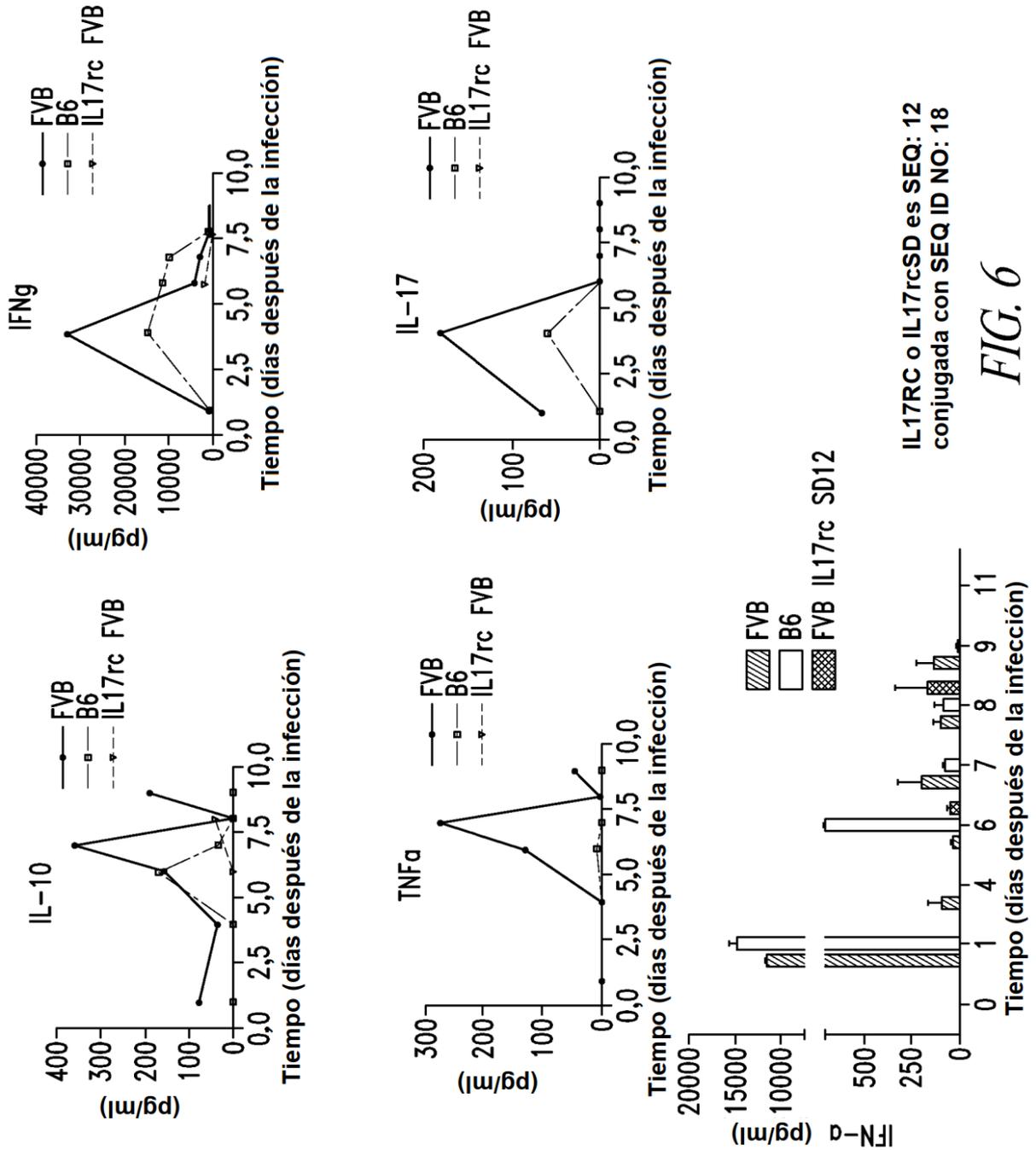


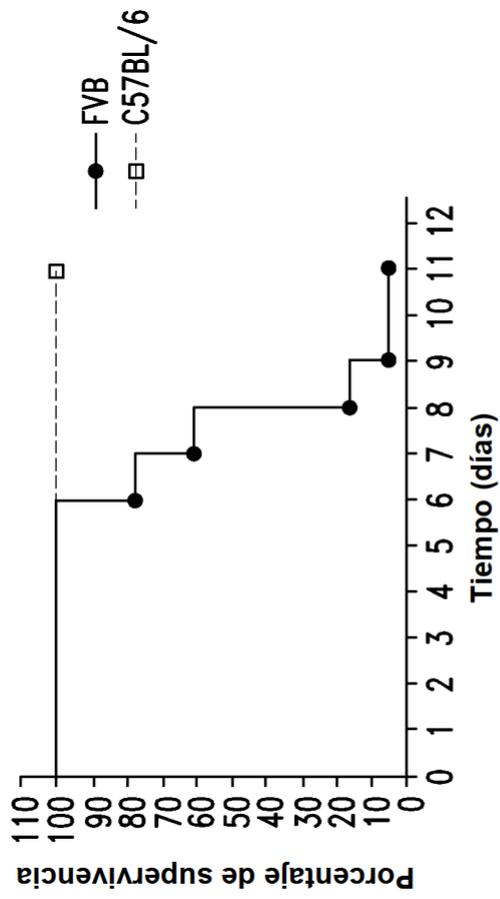
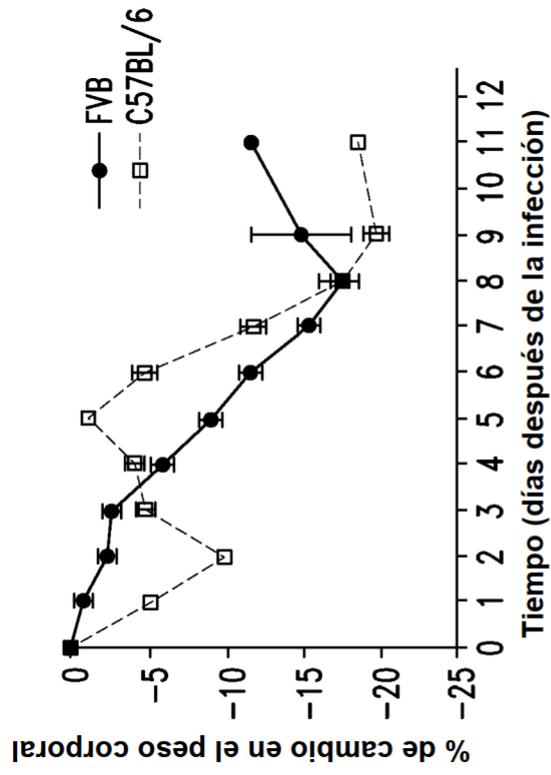
FIG. 5

IL17RC-SD12 es SEQ: 12 conjugada con SEQ ID NO: 18



IL17RC o IL17rcSD es SEQ: 12  
conjugada con SEQ ID NO: 18

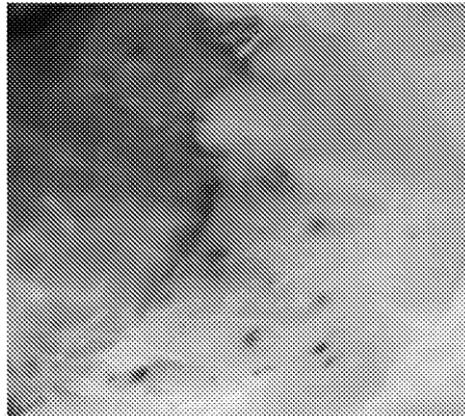
FIG. 6



Se infectaron ratones FVB y C57BL/6 con LCMV CI 13

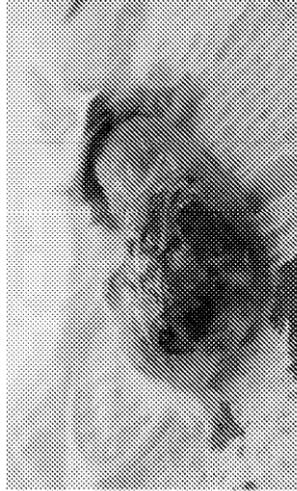
FIG. 7A

FIG. 7B



*FIG. 8A*

FVB infectados con LCMV



*FIG. 8B*



*FIG. 8C*

C57BL/6 infectados con LCMV

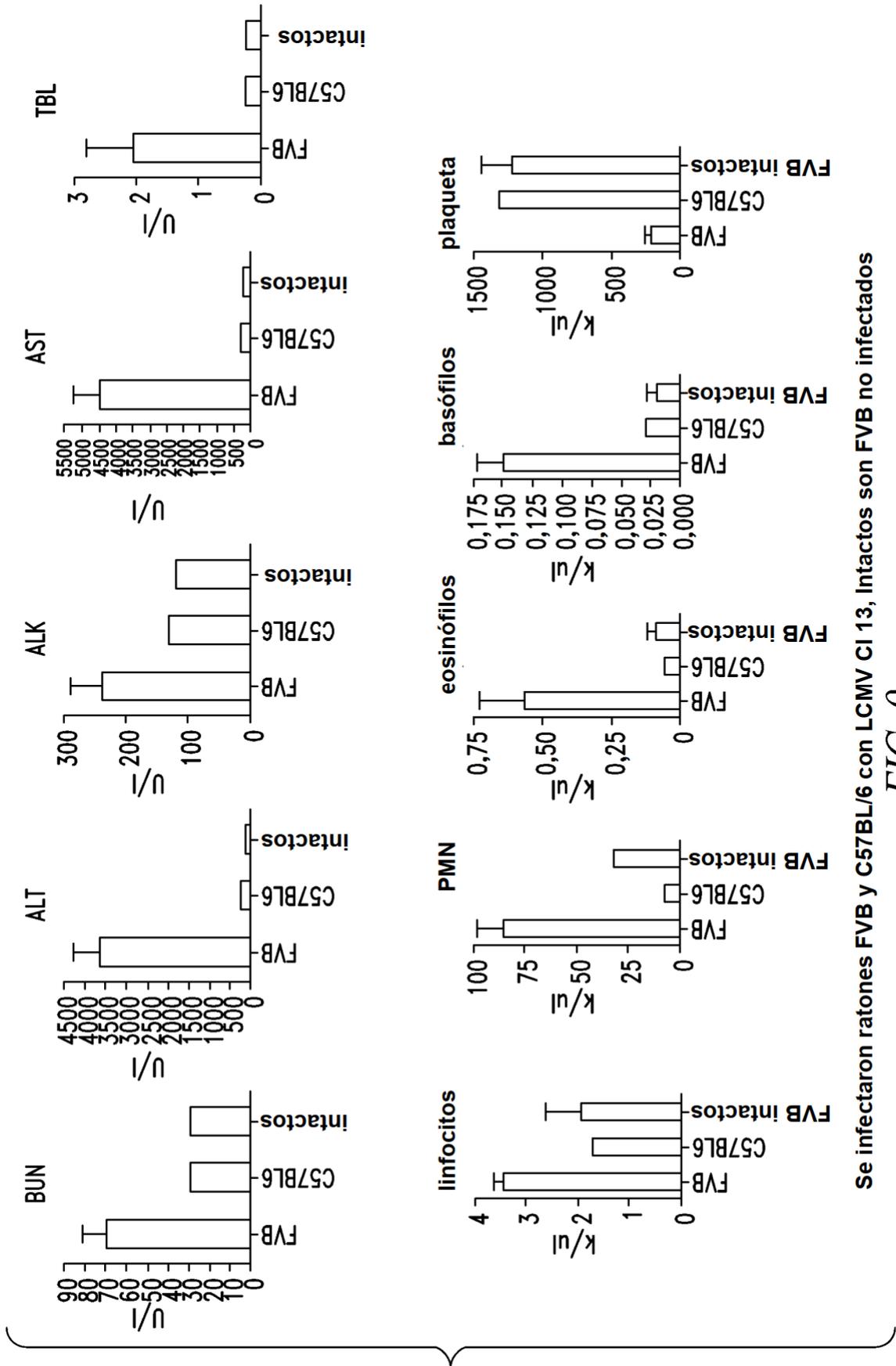


*FIG. 8D*

FVB intactos

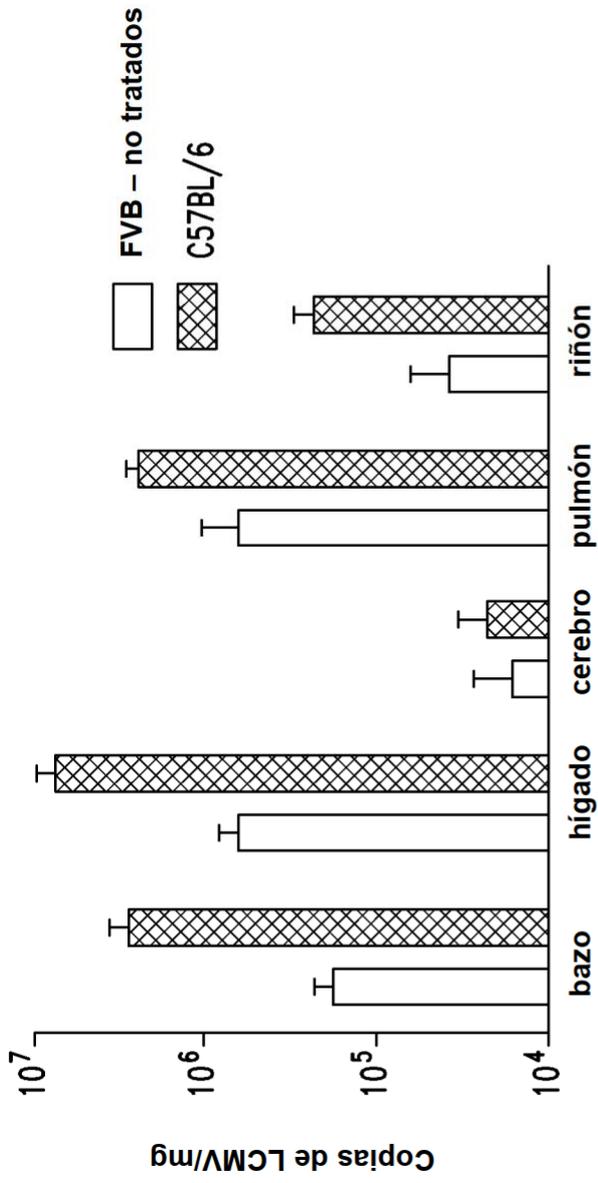


*FIG. 8E*



Se infectaron ratones FVB y C57BL/6 con LCMV CI 13, Intactos son FVB no infectados

FIG. 9



Se infectaron ratones FVB y C57BL/6 con LCMV CI 13

*FIG. 10*