

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/059612 A1

(43) Fecha de publicación internacional
10 de mayo de 2012 (10.05.2012)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07H 21/02 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/28 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070740

(22) Fecha de presentación internacional:
26 de octubre de 2011 (26.10.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201031622
4 de noviembre de 2010 (04.11.2010) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA** [ES/ES]; Campus de Bellaterra, E-08193 CERDANYOLA DEL VALLES (Barcelona) (ES). **UNIVERSIDAD DE BARCELONA** [ES/ES]; Baldiri i Reixac, 4 y 6 - Torre D, E-08028 Barcelona (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
OCAMPO, Sandra Milena [CO/ES]; Instituto de Química Avanzada de Cataluña, Jorge Girona Salgado,

18-26, E-08034 Barcelona (ES). **ERITJA CASADELLÁ, Ramón** [ES/ES]; Instituto de Química Avanzada de Cataluña, Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **ROMERO PRADA, Carolina** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, E-08193 CERDANYOLA DEL VALLES (Barcelona) (ES). **BURGUEÑO BANÚS, Juan Francisco** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, E-08193 CERDANYOLA DEL VALLES (Barcelona) (ES). **FERNÁNDEZ GIMENO, Ester** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, E-08193 CERDANYOLA DEL VALLES (Barcelona) (ES). **PERALES, José Carlos** [ES/ES]; Universidad de Barcelona, Baldiri i Reixac, 4 y 6 - Torre D, E-08028 Barcelona (ES).

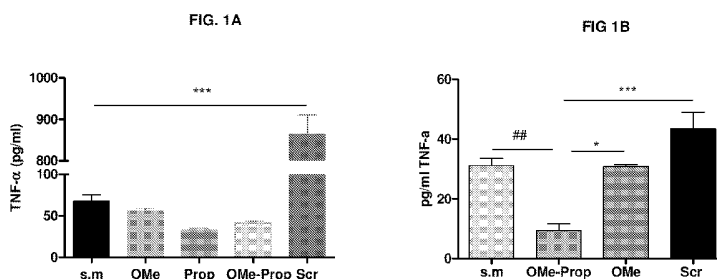
(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: DERIVATIVES OF SMALL INTERFERING RNAS AND USE THEREOF

(54) Título : DERIVADOS DE PEQUEÑOS ARN DE INTERFERENCIA Y SU USO



(57) Abstract: The present invention relates to a small interfering RNA (siRNA) specific for tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), being 2'-O-methyl modified and there being attached thereto by a phosphodiester bond a group R in position 3', wherein R is selected from among: a C₁-C₆ alkyl substituted with at least one -OH group, in particular propanediol; a C₄-C₆ cycloalkyl substituted with at least one -OH group; a C₄-C₆ heterocycloalkyl; a heteroalkyl chain having between 2 and 7 atoms, wherein at least one thereof is an oxygen atom or a sulphur atom, the chain preferably being substituted with at least one -OH group; and a heteroaryl, the ring whereof being formed of between 3 and 6 atoms and at least one of said atoms being an oxygen atom. The present invention furthermore refers to the use of said siRNA for the treatment of inflammatory diseases, preferably inflammatory bowel disease. DRAWING: FIGs. 1A and 1B: s.m no medication

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un pequeño ARN de interferencia (pARNi) específico frente al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), con modificaciones 2'-O-metil y que lleva unido mediante un enlace fosfodiéster un grupo R a la posición 3', donde R se selecciona entre: un C₁-C₆ alquilo sustituido con al menos un grupo -OH, en especial propanediol; un C₄-C₆ cicloalquilo sustituido con al menos un grupo -OH; un C₄-C₆ heterocicloalquilo; una cadena heteroalquílica entre 2 y 7 átomos, donde al menos uno es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, preferiblemente la cadena está sustituida con al menos un grupo

[Continúa en la página siguiente]

WO 2012/059612 A1



SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL,
PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

DERIVADOS DE PEQUEÑOS ARN DE INTERFERENCIA Y SU USO

La presente invención pertenece al campo de la Biotecnología. La presente invención se refiere a unos nuevos pequeños ARN de interferencia (pARNi) modificados químicamente en los extremos de la cadena acompañante y a su uso en el tratamiento de enfermedades.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La interferencia de ARN es un proceso de silenciamiento de genes post-transcripcional y específico de secuencia, que emplea ARN de doble cadena. Después del descubrimiento de este fenómeno en plantas a principio de los años 90, Andy Fire y Craig Mello demostraron que un ARN de doble cadena era capaz de inhibir la expresión génica de manera específica y selectiva en *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998 Nature, 391(6669) 806-11).

La secuencia de la cadena acompañante coincide con la región correspondiente del ARN mensajero (ARNm) diana. La cadena guía o líder es complementaria a este ARNm. La doble cadena de ARN es varios órdenes de magnitud más eficiente que la cadena líder sola a la hora de silenciar la expresión génica mediante la inducción de la degradación del ARNm.

El proceso de la interferencia de ARN comienza cuando la enzima DICER encuentra un ARN de doble cadena y lo trocea en los llamados pequeños ARN de interferencia (pARNi, del inglés "*small interfering RNAs, o siRNA*"), de unos 20 nucleótidos. Las células cuentan con una maquinaria denominada RISC (del inglés "*RNA-induced silencing complex*"), a la que se incorpora la cadena guía.

Se sabe que las moléculas de pARNi pueden unirse a los receptores de tipo "Toll" presentes tanto en la membrana celular como en el interior de la célula, y estimular la producción de los interferones alfa y beta que, a su vez, producen

una respuesta inmunológica. Esta respuesta inmunológica es inespecífica y enmascara frecuentemente los efectos de los pARNi.

En la solicitud de patente WO2007051303 se describe el efecto de algunas modificaciones químicas en las moléculas de pARNi que disminuyen la respuesta inmunológica. Las modificaciones mencionadas se encuentran en ambas cadenas y son las siguientes: 2'-O-metilo, 2'-deoxi-2'-fluoro, 2'-deoxi y 2'-O-(2-metoxietilo). Otras modificaciones más complejas se describen en WO2006020768. En Van Aerschot *et al*, Bull. Soc. Chim. Belg. 104, nº 12, pp 717-720, 1995 se utiliza un soporte sólido funcionalizado con propandiol para la síntesis de ADN con el fin de incrementar la resistencia a la degradación por 3'-exonucleasas.

En cuanto a la enfermedad del intestino inflamado, algunas de las principales características de la enfermedad del intestino inflamado son la pérdida de la tolerancia a los microbios intestinales, la activación de las células responsables de la inmunidad y la producción de cantidades elevadas de varias citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa, TNF- α y la interleuquinas IL-1beta, IL-6 y IL-8 por parte de los inmunocitos y también de las células de la mucosa intestinal. Estas citoquinas captan células inmunocompetentes que amplifican la respuesta inflamatoria. TNF- α tiene un papel central en el proceso inflamatorio debido a su capacidad de incrementar su propia expresión al mismo tiempo que incrementa la expresión de otras moléculas proinflamatorias. Los sueros y las mucosas intestinales de pacientes de la enfermedad del intestino inflamado muestran niveles de TNF- α elevados y se han detectado cantidades elevadas de TNF- α en modelos de la enfermedad del intestino inflamado como son los modelos animales de colitis. La inhibición de TNF- α mediante anticuerpos, receptores solubles o inhibidores de la fosfodiesterasa IV, como el rolipram, ha mejorado sensiblemente o incluso ha prevenido la inflamación en estos modelos animales. Sin embargo, se han descrito varios efectos secundarios como por ejemplo un incremento en la vulnerabilidad a patógenos intracelulares o reacciones autoinmunes. De cara a reducir los

efectos secundarios, es conveniente incrementar la selectividad del órgano al que va dirigido el tratamiento. A este respecto, la solicitud de patente WO2006097768 describe el uso de pARNi capaces de inhibir la expresión de la IL-12 para el tratamiento de enfermedades intestinales y su administración por vía intrarectal, y la solicitud WO0020645 describe oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión de TNF- α . Sin embargo estas solicitudes no hacen referencia a posibles modificaciones químicas para la disminución de la respuesta inmune inespecífica.

10 El grupo del Dr. Ramratnam utiliza pARNi sin modificar (Zhang et al. Mol. Ther. 2006, 14: 336-42) y demuestra que estos pARNi pueden disminuir los niveles de ARNm de TNF- α y mejorar su perfil histológico pero no el desarrollo clínico de la enfermedad.

15 Por todo esto, es importante desarrollar nuevas estrategias que permitan, por un lado, disminuir los efectos secundarios asociados a los tratamientos con pARNi y, por otro lado, dirigir el tratamiento a las zonas que se deseen tratar, como es únicamente al intestino en la enfermedad del intestino inflamado.

20 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a compuestos derivados de pequeños ARN de interferencia (pARNi) basados en las modificaciones químicas 2'-O-metilo y en la unión de una pequeña molécula alquílica polar, que confieren al dúplex de ARN unas propiedades sorprendentemente ventajosas para silenciar la expresión génica sin apenas provocar efectos secundarios inflamatorios. Por ejemplo, los pARNi de la invención son capaces de inhibir la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) sin provocar efectos secundarios de estimulación de la respuesta inmune y de mejorar los resultados clínicos en un modelo de colitis.

Que las modificaciones químicas 2'-O-metilo en un pARNi disminuyen la respuesta inmunológica y la inflamación, es algo ya descrito en la solicitud de patente WO2007051303. Sin embargo, los derivados de pARNi de la invención, modificados con una pequeña molécula alquílica polar además de las
5 modificaciones 2'-O-metilo, tienen un efecto sorprendentemente mucho más beneficioso a la hora de inhibir la expresión génica sin provocar la estimulación de la respuesta inmune. Estas dos modificaciones de los pARNi: 2-O-metilo y unión de una pequeña molécula alquílica, cuando se realizan por separado consiguen unos efectos mucho menos efectivos. Además, el efecto que se
10 consigue mediante la combinación de estas dos modificaciones es mucho mayor que la suma de los efectos individuales, es decir, presenta un efecto sinérgico beneficioso e inesperado.

Los compuestos de la presente invención incrementan la eficacia inhibitoria de
15 TNF- α en cultivos celulares y en animales. Además, esas modificaciones introducidas en los pARNi reducen la estimulación inmunológica no específica en células PBMC humanas, mejorando por tanto el perfil farmacológico.

La presente invención se refiere también a una composición que comprende
20 dichos pARNi modificados, así como al uso de los pARNi o de dicha composición para la preparación de un medicamento.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto (en adelante llamado compuesto de la invención) de fórmula
25 pARNi-P-O-R donde:

- i) pARNi es un pequeño ARN de interferencia que comprende al menos una modificación 2'-O-metilo;
- 30 ii) -P-O- representa un enlace fosfodiéster que une R a la posición terminal 3' de cualquiera de las cadenas del pARNi;

iii) donde R es un radical que se selecciona entre: un C₁-C₆ alquilo sustituido con al menos un grupo -OH; un C₄-C₆ cicloalquilo sustituido con al menos un grupo -OH; un C₄-C₆ heterocicloalquilo; una cadena heteroalquímica de entre 2 y 7 átomos, donde al menos uno de los átomos de la cadena es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, preferiblemente la cadena está sustituida con al menos un grupo -OH; y un heteroarilo en cual el anillo esta formado entre 3 y 6 átomos y al menos uno de esos átomos es un átomo de oxígeno.

10

El término pequeño ARN de interferencia o pARNi en la presente descripción es indistinto al término siRNA (del inglés "*small interfering RNA*").

15

Un pARNi es un ARN de doble cadena que comprende dos elementos: (a) una cadena guía, también conocida como cadena líder o cadena antisentido, que hibrida con (b) una cadena acompañante, también conocida como cadena sentido. La cadena guía, líder o antisentido es la responsable de la capacidad de esta molécula para interferir en la expresión del ARN mensajero (ARNm) diana del silenciamiento. Dicha cadena guía hibrida con dicho ARNm, provocando finalmente su procesamiento y disminuyendo así la traducción del ARNm a proteína.

20

Un pARNi está compuesto por ribonucleótidos encadenados, pero puede presentar también algún desoxirribonucleótido.

25

Una modificación 2'-O-metilo en un nucleótido es a la unión de un grupo oximetilo en la posición 2' del nucleótido, es decir, en el segundo carbono de la pentosa.

30

La posición 3' es obviamente la posición 3' del nucleótido terminal, situado en el extremo 3' de cualquiera de las dos cadenas del pARNi, ya que en los

demás nucleótidos, la posición 3' está ocupada en la unión al siguiente nucleótido de la cadena mediante un enlace fosfodiéster.

Un grupo -OH es un grupo hidroxilo libre.

5

Para la unión de R al pARNi mediante un enlace fosfodiéster es necesario que el grupo que se va a incorporar presente al menos un grupo hidroxilo libre, cuyo átomo de oxígeno formará el enlace con el pARNi. El enlace fosfodiéster puede ser tal enlace o cualquier otro que cumpla la misma función, aunque
10 preferiblemente es un enlace fosfodiéster.

En una realización preferida de la invención, el compuesto de la invención es antiinflamatorio. Preferiblemente, la cadena guía del pARNi del compuesto de la invención inhibe o silencia, total o parcialmente, la expresión de una
15 molécula proinflamatoria.

El término "inhibir o silenciar", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la disminución de la expresión génica que ocurre cuando el pARNi hibrida específicamente con el ARNm al que está dirigido e induce su
20 degradación. Se dice que la expresión génica está inhibida o silenciada cuando la cantidad de ARNm de un determinado gen decrece o desaparece respecto a los niveles originales de partida. La cantidad o los niveles de ARNm pueden ser determinados por múltiples técnicas conocidas por el experto en la materia, como pueden ser, pero sin limitarse, la reacción en cadena de la polimerasa
25 (PCR) u otras técnicas de hibridación con sondas específicas.

En la presente descripción, se entiende por moléculas proinflamatorias aquellas moléculas que participan en la inflamación, promoviendo dicho proceso. Existe una gran variedad de moléculas proinflamatorias, entre las que se encuentran
30 la interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 8 (IL-8), las prostaglandinas, el óxido nítrico, el interferón γ y el factor de necrosis tumoral (TNF). Además, existen algunas enzimas proinflamatorias, como la fosfolipasa de tipo II o PLA₂, la

ciclooxigenasa 2 (COX-2) o la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), que activan la síntesis de factor activador de plaquetas, leucotrienos, prostanoïdes u óxido nítrico.

- 5 En una realización preferida del compuesto de la invención, la cadena guía del pARNi inhibe o silencia, total o parcialmente, la expresión de al menos uno de los genes de la lista que comprende: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 beta, IL-6 e IL-8. Preferiblemente, la cadena guía del pARNi del compuesto de la invención inhibe o silencia, total o parcialmente, la expresión del gen de
- 10 TNF- α o la del gen de IL-1 beta. Más preferiblemente, la cadena guía del pARNi del compuesto de la invención inhibe o silencia, total o parcialmente, la expresión del gen de TNF- α .

El factor de necrosis tumoral o TNF- α (del inglés "*tumor necrosis factor alpha*")

15 es el primer miembro de la superfamilia de TNF, a la que pertenecen algunas citoquinas implicadas en la fase aguda del proceso inflamatorio. Los miembros de esta superfamilia tienen un origen filogenético común y la mayoría tienen también una función común: promueven la apoptosis y la activación del factor de transcripción NF- κ B.

20

En una realización preferida del compuesto de la invención, R es un alquilo C₁-C₆ sustituido con al menos un grupo hidroxilo libre. Preferiblemente, R es un alquilo C₂-C₄ sustituido con uno o dos grupos hidroxilos libres.

- 25 En una realización preferida del compuesto de la invención, R es etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo o terbutilo. Preferiblemente, el enlace fosfodiéster une una molécula de 1,2-propandiol o 1,3-propandiol, preferiblemente de 1,3-propandiol, a la posición 3' de cualquiera de las cadenas del pARNi. Dado que un grupo hidroxilo se utiliza para la formación del enlace, sólo quedaría un
- 30 grupo hidroxilo libre.

En una realización preferida del compuesto de la invención, R es un C₄-C₆ cicloalquilo sustituido con al menos un grupo hidroxilo libre. Preferiblemente, R es ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo donde R está sustituido con uno o dos grupos hidroxilos libres. Más preferiblemente, el enlace fosfodiéster une una molécula de 4-ciclohexandiol a la posición 3' de cualquiera de las cadenas del pARNi.

En otra realización preferida del compuesto de la invención, R es un C₄-C₆ heterocicloalquilo, preferiblemente sustituido con al menos un grupo hidroxilo libre. Preferiblemente, R es un oxetanilos (C₄), aziridinilos (C₃), azetidínilos (C₄), tetrahidrofuranilos (C₅), pirrolidinilos (C₅), morfolinilos (C₆), ditianilos (C₆), tiomorfolinilos (C₆), piperidinilos (C₆), tetrahidropiranilos (C₆), piperazinilos (C₆) o trítianilos (C₆). Más preferiblemente, R es 4-metilpiperazinilo, 3-metil-4-metilpiperazine, 4-dimetilaminopiperidinilo, 4-metilaminopiperidinilo, 4-aminopiperidinilo, 3-dimetilaminopiperidinilo, 3-metilaminopiperidinilo, 3-aminopiperidinilo, 4-hidroxipiperidinilo, 3-hidroxipiperidinilo, 2-hidroxipiperidinilo, 4-metilpiperidinilo, 3-metilpiperidinilo, 3-dimetilaminopirrolidinilo, 3-metilaminopirrolidinilo, 3-aminopirrolidinilo o metilmorfolinilo.

En otra realización preferida del compuesto de la invención, R es una cadena heteroalquílica de entre 2 y 7 átomos, donde al menos uno de los átomos de la cadena es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, preferiblemente la cadena está sustituida con al menos un grupo hidroxilo libre. Preferiblemente, R es una cadena heteroalquílica de entre 4 y 6 átomos donde al menos uno de los átomos de la cadena es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, preferiblemente la cadena está sustituida con al menos un grupo hidroxilo libre. Más preferiblemente, el enlace fosfodiéster une una molécula de dietilenglicol o dietilenglicoltioéter a la posición 3' de cualquiera de las cadenas del pARNi.

En una realización preferida del compuesto de la invención, R es un heteroarilo formado por entre 3 y 6 átomos y al menos uno de esos átomos es un átomo

de oxígeno. Preferiblemente, R es tienilo, furanilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo o imidazolilo.

5 En una realización preferida del compuesto de la invención, R está sustituido con dos o tres grupos hidroxilo. Preferiblemente, R se selecciona de la lista que comprende: 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 3-amino-1,2-propanodiol, 2,2-dimetil-1,3-propanodiol, glicerol, etilenglicol, dietilenglicol, dietilenglicoltioéter, 1,6-hexandiol, ciclohexandiol.

10 En una realización preferida del compuesto de la invención, R esta unido a través de un enlace fosfodiéster a la posición terminal 3' de la cadena acompañante.

15 Las modificaciones del pARNi del compuesto de la invención pueden llevarse a cabo según cualquiera de los métodos conocidos hasta la fecha, incluidos los descritos en los ejemplos de la presente memoria, o como se describe en Vaishnaw, AK *et al.* 2010. Silence. 1:14.

20 En una realización preferida del compuesto de la invención, entre 1 y 7 nucleótidos que forman el pARNi, preferiblemente de la cadena acompañante, comprenden una modificación 2'-O-metilo. Preferiblemente, entre 2 y 4 nucleótidos, preferiblemente de la cadena acompañante, comprenden una modificación 2'-O-metilo. Más preferiblemente, 2 nucleótidos, preferiblemente de la cadena acompañante, comprenden una modificación 2'-O-metilo.

25 En una realización preferida del compuesto de la invención, los nucleótidos que forman el pARNi que comprenden la modificación 2'-O-metilo están en el extremo 5'. Preferiblemente, los nucleótidos que forman el pARNi que comprenden modificaciones 2'-O-metilo están en la cadena acompañante, y
30 preferiblemente en el extremo 5' de la cadena acompañante.

En una realización preferida del compuesto de la invención, al menos un nucleótido que forma el pARNi, preferiblemente de la cadena acompañante, es un desoxirribonucleótido. Preferiblemente, al menos un nucleótido del extremo 3' del pARNi, preferiblemente de la cadena acompañante, es un desoxirribonucleótido. Más preferiblemente, 2 nucleótidos del extremo 3' del pARNi, preferiblemente de la cadena acompañante, son desoxirribonucleótidos.

En una realización preferida del compuesto de la invención, los desoxirribonucleótidos del extremo 3' del pARNi son desoxirribonucleótidos de timidina (dT). Preferiblemente, los desoxirribonucleótidos están en el extremo 3' de la cadena acompañante del pARNi

En una realización preferida del compuesto de la invención, cada cadena del pARNi comprende entre 15 y 40 nucleótidos. Preferiblemente, cada cadena comprende entre 17 y 30 nucleótidos. Más preferiblemente, cada cadena comprende entre 18 y 25 nucleótidos.

En una realización preferida del compuesto de la invención, la secuencia de la cadena acompañante del pARNi es SEQ ID NO: 1. En una realización preferida del compuesto de la invención, la secuencia de la cadena guía del pARNi es SEQ ID NO: 2. En una realización preferida del compuesto de la invención, la secuencia de la cadena acompañante del pARNi es SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la cadena guía del pARNi es SEQ ID NO: 2.

La síntesis del compuesto de la invención puede llevarse a cabo según cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica, o como se describe en Reese CB. Organic Biomolecular Chemistry. 2005, 3:3851-68.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el compuesto de la invención, en adelante llamada composición farmacéutica de la invención.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 5 El "vehículo" o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición
- 10 farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

15

- En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el vehículo o diluyente es un agente de transfección. Preferiblemente, el agente de transfección se selecciona de la lista que comprende polietilenglicol, colesterol, polietilenimida (PEI), péptidos de penetración celular, oligoarginina, poli-lisina,
- 20 glicoproteína del virus de la rabia, nanopartículas de oro, dendrímeros, nanotubos de carbono y lípidos.

- Un agente de transfección es cualquier sistema que permite o facilita la transfección, es decir, la introducción de un ácido nucleico en una célula. En la
- 25 presente descripción, un agente de transfección es una molécula que facilita o permite la entrada de los pARNi de la invención o de la composición que los comprende, en una célula.

- Preferiblemente, el agente de transfección es un lípido. Más preferiblemente, el
- 30 lípido es un lípido catiónico. Aún más preferiblemente, el lípido catiónico es un liposoma.

En otra realización aún más preferida, la composición farmacéutica además comprende otra sustancia biológicamente activa. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o
5 recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico. El término "sustancia biológicamente activa" es toda materia, cualquiera que sea su origen humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo, a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento.

10

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto o de la composición farmacéutica de la invención para la preparación de un medicamento.

15 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el compuesto o la composición farmacéutica de la invención se usan para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. Preferiblemente, la enfermedad inflamatoria se selecciona de la lista que comprende: enfermedad del intestino inflamado, artritis reumatoide, osteoartritis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
20 Más preferiblemente, la enfermedad inflamatoria es intestinal, preferiblemente es la enfermedad del intestino inflamado.

El compuesto o la composición farmacéutica de la invención pueden usarse para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el síndrome
25 del colon irritable, la enfermedad infecciosa del intestino, la colitis pseudomembranosa, la amebiasis, la tuberculosis intestinal, los pólipos crónicos, la enfermedad diverticular, el estreñimiento, la obstrucción intestinal, el síndrome de mala absorción, la diarrea o el cáncer colorrectal.

30 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el compuesto o la composición farmacéutica de la invención se usan para el tratamiento de una enfermedad que se selecciona de la lista que comprende: enfermedad de

Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del colon irritable, enfermedad infecciosa del intestino, colitis pseudomembranosa, amebiasis o tuberculosis intestinal, pólipos crónicos, enfermedad diverticular y cáncer colorrectal. Preferiblemente, la enfermedad es la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o el síndrome del colon irritable.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el compuesto o la composición farmacéutica que lo contiene se administra por vía intrarrectal. Para dicha administración se pueden emplear, pero sin limitarse, supositorios o enemas en el recto.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto o de la composición farmacéutica de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad que, administrada en dosis y durante el período de tiempo necesario, es efectiva a la hora de conseguir el resultado profiláctico o terapéutico deseado. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" del compuesto o de la o de la composición farmacéutica de la invención puede variar con el estadio de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y se refiere a una cantidad que no presenta efectos adversos ni toxicidad y es capaz de alcanzar el efecto profiláctico o terapéutico deseado.

Un realización de la invención puede ser un compuesto en el que cada cadena del pARNi tiene entre 17 y 30 nucleótidos, comprende entre dos y cuatro modificaciones 2'-O-metilo en los nucleótidos el extremo 5' de la cadena acompañante, una modificación con un 1,2-propandiol en el extremo 3' de la cadena acompañante unida mediante un enlace fosfodiéster y los entre dos y cuatro nucleótidos del extremo 3' de la cadena acompañante son desoxirribonucleótidos.

Otra realización de la invención puede ser una composición farmacéutica que comprende un compuesto que inhibe o silencia la expresión de IL-1 en el que

5 cada cadena del pARNi tiene entre 20 y 26 nucleótidos, comprende entre dos y cinco modificaciones 2'-O-metilo en los nucleótidos de la cadena acompañante y una modificación con un alquilo C₂-C₄ sustituido con dos grupos hidroxilo, unido a la cadena acompañante por su extremo 3' mediante un enlace fosfodiéster y entre dos y cuatro nucleótidos del extremo 3' de la cadena acompañante son desoxirribonucleótidos de timidina.

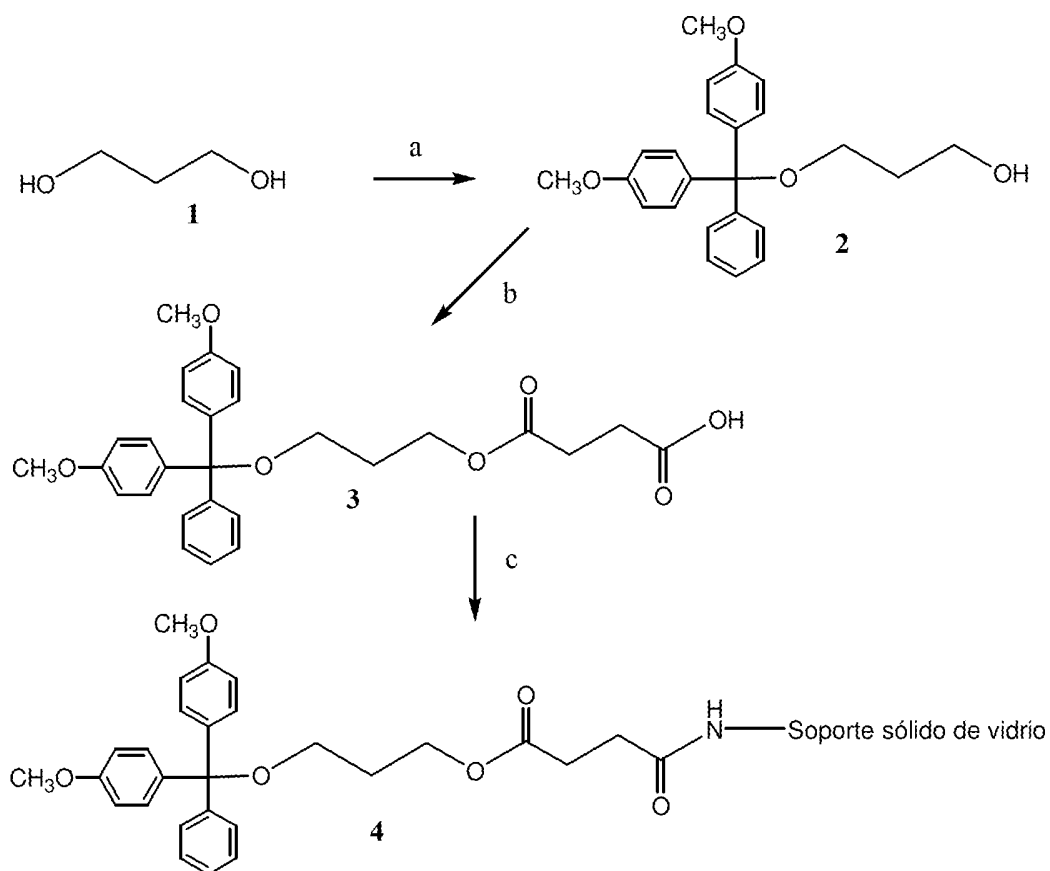
10 Otra realización de la invención puede ser el uso de un compuesto que inhibe la expresión de una molécula proinflamatoria que comprende entre dos y cuatro modificaciones 2'-O-metilo en entre uno y tres nucleótidos del extremo 3' de cualquiera de las cadenas y una modificación con 1,3-propandiol, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal, que se administra por vía intrarrectal en una cantidad terapéuticamente efectiva.

15

Los métodos de síntesis de los compuestos de la invención son conocidos y están disponibles en la técnica. (Reese CB. Organic Biomolecular Chemistry. 2005, 3:3851-68).

20 Por ejemplo, en el siguiente esquema se resumen la síntesis del soporte de vidrio para la síntesis de derivados de ARN que contienen grupos propandiol en el extremo 3'.

15



Esquema 1

(1) es 1,3-propandiol; (a) el reactivo utilizado en esta reacción es el cloruro de dimetoxitritilo (DMT) disuelto en piridina; (2) es 1-O-Dimetoxitritil-1,3-propandiol; (3) es el hemisuccinato de 1-O-Dimetoxitritil-1,3-propandiol, (b) los reactivos utilizados en esta reacción son el anhídrido succínico, y la N,N-dimetilaminopiridina disueltos en diclorometano; (4) es el soporte sólido de vidrio funcionalizado con 1,3-propandiol, (c) los reactivos utilizados en esta reacción son bolas de vidrio funcionalizadas con grupos amino, N,N-dimetilaminopiridina, trifenilfosfina, y 2,2-ditiobis (5-nitropiridina) disueltos en una mezcla de 1,2-dicloroetano y acetonitrilo.

Tabla 1. Nomenclatura de una realización de la invención (OMe-Prop) y de los controles empleados (s.m.: sin modificar; Scr o Scr OMe: pARNi de secuencia aleatoria con modificaciones 2'-O-metilo; OMe: con modificaciones 2'-O-metilo

en el extremo 5' de la cadena acompañante; Prop: con una molécula de 1,3-propandiol unida mediante un enlace fosfodiéster al extremo 3' de la cadena acompañante).

Compuesto	Secuencia cadena guía	Secuencia cadena acompañante	Número de modificaciones 2'-O-metilo	R
s.m.	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 2	0	-
Scr*	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 3	2	-
OMe	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 1	2	-
Prop	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 2	0	1,3-propandiol
OMe-Prop	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 1	2	1,3-propandiol

5 *Scr también puede encontrarse en la memoria como Scr OMe.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas
 10 y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Actividad inhibitoria de TNF- α de ratón *in vitro* de los compuestos de la invención y sus controles en líneas celulares y macrófagos primarios. Sólo los compuestos donde la secuencia de la cadena guía del pARNi es complementaria al ARNm de TNF- α (s.m, OMe, Prop, OMe-Prop)
 20 son capaces de unirse a RISC y silenciar TNF- α , mientras que el pARNi de secuencia aleatoria con modificaciones 2'-O-metilo no inhibe la producción de TNF- α (Scr). **A.** Cantidad de TNF- α producida por células HeLa después de 24 h de tratamiento con el plásmido que expresa TNF- α y los compuestos de la

invención o sus controles. **B.** Cantidad de TNF- α producida por macrófagos peritoneales transfectados con los compuestos de la invención y sus controles. **C.** Cantidad de TNF- α producida por células 4T1 después de 24 h de tratamiento con los compuestos de la invención y sus controles. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó siguiendo el método ANOVA con el post-ensayo de Bonferroni. *** P<0,001 **P<0,01 o *P<0,05 comparado con Scr, el pARNi de secuencia aleatoria, ## P<0,01 comparado con el pARNi sin modificar (s.m.).

10 **Fig. 2. Estimulación de la respuesta inmune producida por la adición de los compuestos de la invención y sus controles.** Las presencia de las modificaciones 2'-O-metilo y/o propandiol disminuye la respuesta inmune a los compuestos, independientemente de la secuencia del pARNi. Células adherentes mononucleares de sangre periférica (PBMC) se transfectaron a una
15 concentración 10 nM de los diferentes compuestos de la invención y sus controles y se midió la cantidad de TNF- α humano producido en los sobrenadantes. OMe-Prop estimula menos la respuesta inmune que s.m. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó siguiendo el método ANOVA con el post-ensayo de
20 Bonferroni. **P<0,01 o *P<0,05 comparado con s.m.

Fig. 3. Inhibición de la producción de TNF- α en un modelo de colitis crónica. Muestra los niveles de ARN mensajero (ARNm) de TNF- α en unidades arbitrarias en el colon de ratones sanos o de ratones con colitis tratados con OMe-Prop o Scr. Los animales con colitis se trataron con OMe-Prop o Scr. Se extrajo el colon, se aisló el ARNm y se midieron los niveles TNF- α por PCR cuantitativa. El compuesto OMe-Prop es capaz de disminuir la producción de TNF- α con respecto a Scr. El análisis estadístico se realizó siguiendo el método ANOVA con el post-ensayo de Bonferroni. **P<0,01.

Fig. 4. Resultado clínico observado en un modelo de colitis crónica como resultado de la administración de los compuestos de la invención y sus controles. Los compuestos de la invención mejoran el resultado clínico en un modelo de colitis crónica. Los animales con colitis se trataron con OMe-Prop, s.m., OMe o con Scr y se observaron hasta los 8 días, durante los cuales se midieron varios indicadores de la enfermedad y se evaluó el índice de actividad de la enfermedad (IAD). Los ratones se sacrificaron a los 8 días del inicio del experimento y se les extrajo el colon para evaluar la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y realizar la observación histológica. Los ratones control son ratones sanos en los que no se indujo la colitis. **A.** Cambios observados en el peso. **B.** Variación del índice de actividad de la enfermedad (IAD). **C.** Media de los índices de la actividad de la enfermedad (IAD) de los animales tratados a día 8. **D.** Media de la longitud del colon en cm de los animales tratados a día 8. **E.** Media del peso del colon en mg de los animales tratados a día 8. **F.** Media de la relación entre el peso en mg y la longitud del colon en mm de los animales tratados a día 8. **G.** Media de los niveles de mieloperoxidasa (MPO) en unidades por mg de colon determinado en el colon de los animales tratados a día 8. El análisis estadístico se realizó siguiendo el método ANOVA con el post-ensayo de Bonferroni. *** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ o * $P < 0,05$ comparado con los controles sanos, ## $P < 0,01$ comparando s.m. con Scr OMe, +++ $P < 0,001$ comparando OMe-Prop con Scr OMe.

EJEMPLOS

25 EJEMPLO 1: Síntesis de los compuestos.

Las secuencias de ARN se ensamblaron utilizando el método de síntesis en fase sólida. Las cadenas acompañantes portadoras del grupo propandiol en el extremo 3' con o sin las unidades de 2'-O-metil-ARN en las dos posiciones finales cercanas al extremo 5': 5'-(mG)(mU)GCCUAUGUCUCAGCCUC-dT-dT-propandiol-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-GUGCCUAUGUCUCAGCCUC-dT-dT-

propandiol-3' (SEQ ID NO: 2) se ensamblaron en un soporte sólido de vidrio siguiendo el esquema 1.

Preparación del soporte sólido funcionalizado con 1,3-propandiol.

5

Como se muestra en el esquema 1, 1-O-dimetoxitritil-1,3-propandiol (0,1 milimoles) preparado según se describe en Van Aerschot *et al.* Bull. Soc. Chim. Belg. 104, nº 12, pp 717-720, 1995; se disolvió en diclorometano (DCM) (1 ml) junto con N,N-dimetilaminopiridina (1,5 eq) y anhídrido succínico (1,5 eq). La
10 reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 16 horas (h). La solución resultante se diluyó con 5 ml de DCM y la solución orgánica resultante se lavó 2 veces con una solución 0,1 M de Na₂HPO₄. La capa orgánica resultante se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente. El residuo que contiene el hemisuccinato deseado se usó
15 directamente en el siguiente paso sin más purificación.

Se disolvieron 0,1 milimoles de 2,2-ditio-bis-(5-nitropiridina) (DTB) en 0,4 ml de acetonitrilo y la solución resultante se mezcló con una solución que contiene 0,1 milimoles del hemisuccinato y N,N-dimetilaminopiridina (0,1 milimoles)
20 disueltos en 0,5 ml de acetonitrilo (ACN). Una mezcla de 0,1 milimoles de trifenilfosfina (TPP) y 0,2 ml de ACN se añadieron a la solución anterior a temperatura ambiente.

La mezcla se agitó con un agitador orbital durante unos segundos y se añadió
25 a una jeringa que contenía 0,5 g de bolas de vidrio de poro controlado funcionalizadas con grupos amino. Se dejó la reacción agitándose suavemente durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de 0,5 ml de metanol y se separó el soporte sólido de la solución. El soporte sólido se lavó tres veces con metanol (10 ml por lavado), tres veces con ACN (10 ml
30 por lavado) y tres veces con éter etílico (10 ml por lavado). El soporte se secó al vacío y se trató con la solución de acetilación que consta de una mezcla de dos soluciones: 1) 0,5 ml de una solución de anhídrido

acético:piridina:tetrahidrofurano (1:1:8) y 2) 0,5 ml de una solución de 10 % N-metilimidazol en tetrahidrofurano. Al cabo de 30 minutos, el soporte sólido se lavó igual que arriba con metanol, acetonitrilo y éter etílico. El soporte se secó al aire y después al vacío y se guardó a 4^o C. El grado de funcionalización se determinó por eliminación del grupo dimetoxitritilo (DMT) de una alícuota con una solución ácida y posterior lectura de la absorción del catión DMT liberado del soporte a 500 nm. El grado de funcionalización fue de 35 nanomoles/g.

Síntesis de oligonucleótidos

10

Los oligorribonucleótidos se prepararon utilizando un sintetizador de la casa comercial Applied Biosystems modelo 3400 utilizando fosforamiditos de 2-cianoetilo y los protectores de tipo terbutildimetilsilil (TBDMS) para la protección del grupo hidroxilo en la posición 2'. Se utilizaron las siguientes soluciones: 0,4 M 1H-tetrazol en ACN (catalizador); 3% ácido tricloroacético en DCM (destritilación), anhídrido acético:piridina:tetrahidrofurano (1:1:8) (solución de acetilación A), 10 % N-metilimidazol en tetrahidrofurano (solución de acetilación B), 0,01 M iodo en tetrahidrofurano:piridina:agua (7:2:1) (oxidación). En las secuencias de RNA, se eliminó el último DMT ya que el grupo DMT no es totalmente estable al tratamiento de fluoruro. El rendimiento medio por etapa de adición de un nucleótido fue alrededor del 97-98% para los monómeros de RNA. Los soportes poliméricos obtenidos se trataron con una solución concentrada de amoníaco-etanol (3:1) durante 1 h a 55^o C. Los soportes se lavaron con etanol y las soluciones resultantes se combinaron y se evaporaron a sequedad. Los productos resultantes se trataron con 0,15 ml de trietilamina-tris(hidrofluoruro):trietilamina:N-metilpirrolidona (4:3:6) durante 2,5 h a 65^o C con el fin de eliminar los grupos TBDMS. Las reacciones se detuvieron por adición de 0,3 ml de isopropoxitrimetilsilano y 0,75 ml de éter. Las mezclas resultantes se agitaron y se enfriaron a 4^o C. Se formó un precipitado que fue centrifugado a 7.000 rpm durante 5 minutos a 4^o C. Los precipitados se lavaron con éter y se centrifugaron de nuevo. Los residuos se disolvieron en agua y los conjugados se purificaron por HPLC. Para la HPLC se empleó la columna

30

Nucleosil 120-10 C18 (250 x 4 mm). Se utilizó un gradiente lineal de 20 minutos desde 0% a 50%; con un flujo de 3 ml/minuto. La composición de las soluciones utilizadas en la HPLC fueron: solución A: 5% ACN en 100 mM acetato de trietilamonio (pH 6,5) y solución B: 70% ACN en 100 mM acetato de trietilamonio pH 6,5. Los productos purificados se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés "*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*").

Los espectros de MALDI-TOF se realizaron en un espectrómetro de masas Perseptive Voyager DETMRP, equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm utilizando un pulso de 3 ns. La matriz utilizada contenía 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP, 10 mg/ml en ACN:agua 1:1) y citrato amónico (50 mg/ml en agua).

Las siguientes secuencias de ARN se obtuvieron de fuentes comerciales (Sigma-Proligo, Dharmacon): cadena acompañante control negativo 5'-(mC)(mA)G UCG CGU UUG CGA CUG G-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 3), cadena guía control negativo 5'-CCA GUC GCA AAC GCG ACU G-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 4), cadena guía anti-TNF- α : 5'-GAG GCU GAG ACA UAG GCA C-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 5), cadena acompañante anti-TNF- α : 5'-GUG CCU AUG UCU CAG CCU C-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 2) y cadena acompañante anti-TNF- α : 5'-(mG)(mU)G CCU AUG UCU CAG CCU C-dT-dT-3' (SEQ ID NO: 1). Los monómeros de tipo ARN (ribonucleótidos) se detallan en letras mayúsculas y la abreviación dT corresponde al desoxirribonucleótido timidina. Los monómeros de tipo 2'-O-metil-RNA se detallan entre paréntesis tal como: (mG), (mU), (mC) y (mA). Las secuencias de pARNi anti-TNF- α están descritas en Sorensen et al. J Mol Biol. 2003, 327: 761-6.

Tabla 2. Caracterización por espectrometría de masas de los derivados de ARN modificados.

Tipo	Abreviatura	Peso molecular experimental	Peso molecular teórico
Cadena acompañante (SEQ ID NO: 1) modificada con 3'-propandiol, 2'-O-Metilo	OMe-Prop	6727	6725
Cadena acompañante (SEQ ID NO: 2) modificada con 3'-propandiol	Prop	6697	6697

5 EJEMPLO 2: Inhibición de TNF- α *in vitro*.

Las cadenas guía y acompañante se hibridaron y el ARN de cadena doble resultante se utilizó para la inhibición de la expresión del gen TNF- α . Primero, se estudiaron las propiedades inhibitorias de los compuestos preparados en el ejemplo 1 en células HeLa. Estas células no expresan el gen de TNF- α de ratón por lo que previamente a la adición de los compuestos se transfectaron las células con un plásmido que contiene el gen de TNF- α de ratón.

En la Figura 1 se muestra el efecto biológico de OMe, OMe-Prop y Prop. La capacidad de silenciamiento de estos compuestos se evaluó tanto en líneas celulares (HeLa) como en cultivos primarios de macrófagos. Los resultados obtenidos con las células Hela utilizando oligofectamina demuestran que el compuesto de la invención OMe-Prop es capaz de unirse a RISC y silenciar TNF- α (Fig. 1A) mientras que el pARNi de secuencia aleatoria (Scr) con modificaciones 2'-O-metilo no inhibe la producción de TNF- α .

Cultivos celulares, transfección y ensayos celulares

Las células HeLa se cultivaron en condiciones habituales: 37° C, 5% CO₂, en medio de Dulbecco modificado por Eagle, 10% suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina suplementado con penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 mg/ml). Todos los experimentos se hicieron a una confluencia celular del 40-60%. Las células HeLa se transfectaron con 250 ng del plásmido que expresa el gen de TNF- α de ratón utilizando lipofectina (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

10

Se utilizaron tres protocolos diferentes de transfección según el tipo de células utilizado:

1.- Una hora después de la transfección con el plásmido que expresa el gen de TNF- α de ratón, las células HeLa se transfectaron con 50nM de los compuestos diseñados para inhibir TNF- α , utilizando oligofectamina (Invitrogen). Al cabo de 48 h se determinó la concentración de TNF- α en los sobrenadantes del cultivo celular utilizando el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Bender MedSystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

20

2. Se aislaron macrófagos peritoneales de ratones no tratados. En el peritoneo de los animales sacrificados se inyectó medio de cultivo y se recogió y aisló el líquido resultante. Las células obtenidas en este líquido se contaron y se sembraron. Este cultivo de macrófagos peritoneales se transfectó con los compuestos utilizando DOTAP (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Al cabo de 20 horas de la transfección, las células se estimularon con lipopolisacárido (LPS) 10 ng/ml durante 10 horas y la cantidad de TNF- α producida se determinó por el ensayo de ELISA.

30

3.-Las células de ratón 4T1 se cultivaron en las condiciones habituales. Estas células expresan el gen del TNF- α de ratón de forma natural. Las soluciones que contienen 100 nM de cada uno de los compuestos y sus controles y un

10% de suero fetal bovino se incubaron unos minutos antes de su adición a las células. Al cabo de 24 h se determinó la cantidad de TNF- α producida por las células mediante un ensayo de tipo ELISA.

5 Preparación de células adherentes mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés "*peripheral blood mononuclear cells*")

Las PBMC se obtuvieron a partir de plasma humano utilizando la separación por gradientes de densidad utilizando Ficoll. Las poblaciones enriquecidas de
10 monocitos se aislaron por su adherencia en plástico. Después de 3 horas de incubación a 37^o C, las células se transfectaron con los compuestos y sus controles durante 18 horas utilizando DOTAP (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de células se colectaron y la cantidad de TNF- α producida bajo immunoestimulación se determinó por
15 ELISA.

Para evaluar los efectos secundarios de la transfección de los compuestos y sus controles, independientes del gen diana que se quiere silenciar, se realizó la transfección del cultivo primario de macrófagos con s.m, OMe, OMe-Prop y
20 con Scr. Como puede observarse en la Figura 1B, OMe-Prop muestra una mejora clara en la eficiencia inhibitoria, incrementado la resistencia a las nucleasas. Este efecto beneficioso se vuelve a reproducir cuando se utiliza OMe-Prop en células 4T1 (Figura 1C).

25 La capacidad immunoestimuladora de los pARNi modificados se analizaron en PBMC procedentes de humanos sanos. Los pARNi diseñados para inhibir el TNF- α de ratón no pueden inhibir la expresión del TNF- α humano producido por las PBMC. Así, si se produce una estimulación de la producción de TNF- α humano, esta estimulación es un efecto inespecífico. En la figura 2 se muestra
30 la producción de TNF- α humano como respuesta no específica de la adición de pARNi sin modificar o modificados. En esta figura se muestra claramente que OMe-Prop, produce una reducción del 20 al 50% de la actividad

inmunoestimuladora, comparado con s.m., a una concentración de 10 nM. Estos datos confirman que las modificaciones desarrolladas en esta invención provocan una respuesta inespecífica mucho menor que los pARNi sin modificar. Por lo tanto se demuestra que los efectos biológicos observados son
5 específicos de la inhibición de TNF- α y no una respuesta inmunológica general inducida por los pARNi.

EJEMPLO 3: Inhibición de TNF- α *in vivo*.

10 Se evaluó el impacto terapéutico en un modelo de la enfermedad del intestino inflamado en ratones, administrando los compuestos y sus controles directamente en el colon distal de los animales enfermos (administración rectal). En primer lugar, se evaluó la eficacia inhibidora en este modelo animal midiendo el ARN mensajero (ARNm) de TNF- α por el método de la
15 transcriptasa reversa y PCR cuantitativa, directamente sobre los extractos de ARN mensajero de colon.

Modelo de colitis inducido por 5% de dextrano sulfato sódico (DSS) en ratones C57Bl/6

20 Los experimentos se realizaron con ratones hembras de la cepa C57Bl/6 (Harlan Iberica). Los animales se cuidaron en condiciones habituales a una temperatura de 22^o C y una humedad relativa del 70-80%, en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

25 Todos los protocolos usados con los animales se aprobaron por el comité ético de la Universidad Autónoma de Barcelona y los animales se trataron siguiendo las regulaciones europeas.

30 La solución al 5% de DSS se añadió como agua de bebida a ratones de 10 semanas de vida. 6 animales fueron utilizados como controles sanos y no

recibieron el tratamiento con DSS. 24 animales recibieron el tratamiento con DSS (MP Biomedicals; de peso molecular 36-50 kD) en el agua de bebida.

5 Durante el experimento, todos los animales dispusieron de agua y alimentos *ad libitum* (A04 chow, PanLab). Se controlaron el peso de los animales, la comida y el consumo de agua diariamente en cada jaula.

Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (IAD)

10 Durante el periodo del experimento, los animales se examinaron diariamente el estado de las siguientes variables: (i) estado general del animal, (ii) aspecto del pelo, (iii) aspecto y aparición de sangre en las heces (método de bencidina TMB), (iv) ingestión de comida y bebida (gramos o ml por día).

15 El parámetro IAD se correlaciona bien con la evaluación histopatológica de la inflamación en las invaginaciones intestinales. El IAD se obtiene de la siguiente ponderación: % incremento de peso con respecto al día 1 (PC), de 0 a 4 puntos; consistencia de las heces, de 0 a 4 puntos; aspecto del animal, de 0 a 3 puntos; sangre en heces, de 0 a 3 puntos.

20

Protocolo de tratamiento con los compuestos y sus controles en el modelo de colitis

25 Los compuestos y sus controles se resuspendieron en agua libre de RNAsas y se mezclaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, CA, USA). El complejo se administró en el recto de ratones anestesiados (4 nanomoles por ratón).

Anestesia y eutanasia

30 Una mezcla de Ketamina y xilazina (Imalgene 1000, Merial labs, Rompun 2%, Bayer) se inyectó por vía intraperitoneal a una dosis de 55:15 mg/kg, diluida en tampón salino. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de halotano y

la sangre se extrajo vía punción cardiaca. A continuación, se extrajeron diferentes órganos, que fueron congelados para su análisis posterior.

Actividad de la enzima Mieloperoxidasa (MPO)

5

La MPO se localiza en los gránulos intracelulares de los neutrófilos polimorfonucleares (PMNN) y cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y ión oxígeno. La actividad de MPO es una indicación cuantitativa del grado de infiltración de leucocitos en tejido inflamado. Para la medida de la actividad de MPO se utiliza O-dianisidina (Sigma) como cromógeno. Una unidad de actividad de MPO es la cantidad de enzima que convierte 1 micromol de peróxido de hidrógeno en agua, en un minuto.

10

Histología

15

Las muestras de colon de los animales tratados para histología se lavaron con solución salina de fosfato. Para preservar la morfología y la composición del tejido se fijaron con paraformaldehído al 4% y a continuación se deshidrataron con un gradiente de etanol. El tejido se fijó en parafina en presencia de toluol. El bloque de parafina se cortó en secciones de 8 micrometros de grosor, que se tiñeron con hematoxilina/eosina.

20

Estadística

Todos los datos obtenidos se representaron y se analizaron estadísticamente con un paquete informático (GraphPad Prism versión 5.0 para Windows). Los grupos de tratamiento se analizaron con el método ANOVA de un factor y ensayo posterior no paramétrico (Newman-Koels). *<0,05%, **<0,01% y ***<0,001%.

30

Análisis de los niveles de producción del ARN mensajero de TNF- α en el colon de los ratones por PCR cuantitativa.

Para la purificación del ARN total tanto de células como de tejidos, se ha utilizado el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y para la obtención de ADN molde (ADN copia (ADNc) del ARNm) se realizó la retrotranscripción del ARNm, se utilizo el equipo comercial *Redy-To-Go You-Prime First-Strand Beads* (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido de las muestras a estudiar, se utiliza como molde para amplificarse mediante la PCR cuantitativa. Para detectar la modulación del mensajero de TNF- α se ha utilizado el ensayo con sonda Taqman número Mm00443258_m1 (*Assay on Demand Gene Expression*) en el aparato *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* de Applied Biosystems.

La Figura 3 muestra que el modelo de enfermedad inducido por la administración de una solución el 5% de DSS produce un aumento de los niveles de TNF- α al cabo de 3 días de la administración. Se puede ver el gran incremento de TNF- α en el colon de los ratones que han sido tratados con DSS y Scr, en comparación con los que no han sido tratados con DSS (sanos).

En las condiciones experimentales escogidas (ratones C57Bl/6, 5% de DSS de peso molecular 36-50 KDa durante 3 días), el tratamiento con el compuesto OMe-Prop administrado 56 horas después del inicio del tratamiento con una solución al 5% de DSS, redujo los niveles de ARN mensajero de TNF- α en un 40%, demostrando que el pARNi modificado es efectivo en el modelo de colitis por administración rectal.

La figura 4 muestra que los compuestos de la invención son capaces de detener el desarrollo de la enfermedad como consecuencia de la disminución de los niveles de de ARNm de TNF- α . Se analizaron los parámetros clínicos de la enfermedad a los 8 días después de iniciar el tratamiento con DSS. Los ratones se trataron con los compuestos y sus controles en los días 2 y 4, utilizando 4 nanomoles en cada uno de los tratamientos. La Figura 4 muestra que el tratamiento con OMe-Prop produce una mejora significativa tanto

cualitativa como cuantitativa en los parámetros clínicos de la colitis en los animales tratados, en comparación con los animales tratados con s.m. o con Scr. La longitud del colon (Figura 4D), el peso del colon (Figuras 4A y 4E) y la relación longitud/peso del colon (Figura 4F) son significativamente mejores en los animales tratados con OMe-Prop. El índice de la actividad de la enfermedad (IAD) (figuras 4B y 4C) indica una mejoría en los animales tratados con OMe-Prop. También, la valoración histológica muestra un impacto beneficioso importante en los animales tratados con OMe-Prop. El grado de inflamación determinado por la actividad MPO (Figura 4G) en extractos de colon tratados también muestra una reducción significativa después del tratamiento con OMe-Prop. Pero el parámetro más importante, que es el grado de supervivencia, también es claramente mejor en los animales tratados con OMe-Prop, mostrando que los efectos beneficiosos observados localmente en el grado de inflamación del colon se traducen en una mejora significativa del estado fisiológico general del animal.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula pARNi-P-O-R donde:

5 i) pARNi es un pequeño ARN de interferencia que comprende al menos una modificación 2'-O-metilo;

 ii) -P-O- representa un enlace fosfodiéster que une R a la posición 3' de cualquiera de las cadenas guía y acompañante del pARNi; y

10

 iii) donde R es un radical que se selecciona entre: un C₁-C₆ alquilo sustituido con al menos un grupo -OH; un C₄-C₆ cicloalquilo sustituido con al menos un grupo -OH; un C₄-C₆ heterocicloalquilo; una cadena heteroalquílica de entre 2 y 7 átomos, donde al menos uno de los
15 átomos de la cadena es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, preferiblemente la cadena está sustituida con al menos un grupo -OH; y un heteroarilo cuyo anillo esta formado entre 3 y 6 átomos y al menos uno de esos átomos es un átomo de oxígeno.

20 2.- El compuesto según la reivindicación anterior, donde la cadena guía del pARNi del compuesto de la invención inhibe o silencia, total o parcialmente, la expresión de una molécula proinflamatoria.

25 3.- El compuesto según la reivindicación anterior, donde la cadena guía inhibe o silencia la expresión de al menos uno de los genes de la lista que comprende: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); interleuquina 1 beta; interleuquina 6; e interleuquina 8.

30 4.- El compuesto según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde la cadena guía inhibe o silencia la expresión del gen de TNF- α o del de la interleuquina 1 beta.

- 5.- El compuesto según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, donde la cadena guía inhibe o silencia la expresión del gen de TNF- α .
- 6.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R es un alquilo C₁-C₆ sustituido con al menos un grupo -OH.
- 7.- El compuesto según la reivindicación anterior, donde R es un alquilo C₂-C₄ sustituido con uno o dos grupos -OH.
- 8.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el enlace fosfodiéster une una molécula de 1,2-propandiol o 1,3-propandiol, preferiblemente de 1,3-propandiol, a la posición 3' de cualquiera de las cadenas del pARNi.
- 9.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R es un C₄-C₆ cicloalquilo sustituido con al menos un grupo -OH.
- 10.- El compuesto según la reivindicación anterior, donde el enlace fosfodiéster une una molécula de 4-ciclohexandiol a la posición 3' de cualquiera de las cadenas del pARNi.
- 11.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R es un C₄-C₆ heterocicloalquilo, preferiblemente sustituido con al menos un grupo -OH.
- 12.- El compuesto según la reivindicación anterior, donde R es un oxetanilo, aziridinilo, azetidínilo, tetrahidrofuranilo, pirrolidinilo, morfolinilo, ditianilo, tiomorfolinilo, piperidinilo, tetrahidropiranilo, piperazinilo o tritiano.
- 13.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R es una cadena heteroalquílica de entre 2 y 7 átomos, donde al menos uno de los átomos de la cadena es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre.

- 14.- El compuesto según la reivindicación anterior, donde R es una cadena heteroalquílica de entre 4 y 6 átomos donde al menos uno de los átomos de la cadena es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre.
- 5 15.- El compuesto según la reivindicación anterior, donde el enlace fosfodiéster une una molécula de dietilenglicol o dietilenglicoltioéter a la posición 3' de cualquiera de las cadenas del pARNi.
- 16.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R es un heteroarilo formado por entre 3 y 6 átomos y al menos uno de esos átomos es un átomo de oxígeno.
- 10 17.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R está unido a través de un enlace fosfodiéster a la posición 3' de la cadena acompañante.
- 15 18.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde entre 1 y 7 nucleótidos que forman el pARNi comprenden una modificación 2'-O-metilo.
- 20 19.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los nucleótidos que forman el pARNi que comprenden la modificación 2'-O-metilo están en el extremo 5'.
- 25 20.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los nucleótidos que forman el pARNi que comprenden modificaciones 2'-O-metilo están en la cadena acompañante.
- 30 21.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos un nucleótido que forma el pARNi es un desoxirribonucleótido.

- 22.- El compuesto según la reivindicación anterior, donde al menos un nucleótido del extremo 3' del pARNi es un desoxirribonucleótido.
- 23.- El compuesto según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores,
5 donde los desoxirribonucleótidos del extremo 3' del pARNi son desoxirribonucleótidos de timídina.
- 24.- El compuesto según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores,
10 donde los desoxirribonucleótidos están en el extremo 3' de la cadena acompañante del pARNi.
- 25.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada cadena del pARNi comprende entre 15 y 40 nucleótidos.
- 15 26.- El compuesto según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde la secuencia de la cadena acompañante del pARNi es SEQ ID NO: 1.
- 27.- El compuesto según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores,
20 donde la secuencia de la cadena guía del pARNi es SEQ ID NO: 5.
- 28.- El compuesto según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores,
donde la secuencia de la cadena acompañante del pARNi es SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la cadena guía del pARNi es SEQ ID NO: 5.
- 25 29.- Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 30.- La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, que además comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 31.- La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el vehículo o diluyente es un agente de transfección.

32.- La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el agente de transfección se selecciona de la lista que comprende polietilenglicol, colesterol, polietilenimida (PEI), péptidos de penetración celular, oligoarginina, poli-lisina, glicoproteína del virus de la rabia, nanopartículas de oro, dendrímeros, nanotubos de carbono y lípidos.

33.- La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el agente de transfección es un lípido.

34.- La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el lípido es un lípido catiónico.

35.- La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el lípido catiónico es un liposoma.

36.- La composición farmacéutica según cualquiera de las siete reivindicaciones anteriores, que además comprende otra sustancia biológicamente activa.

37.- Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 o de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 36 para la preparación de un medicamento.

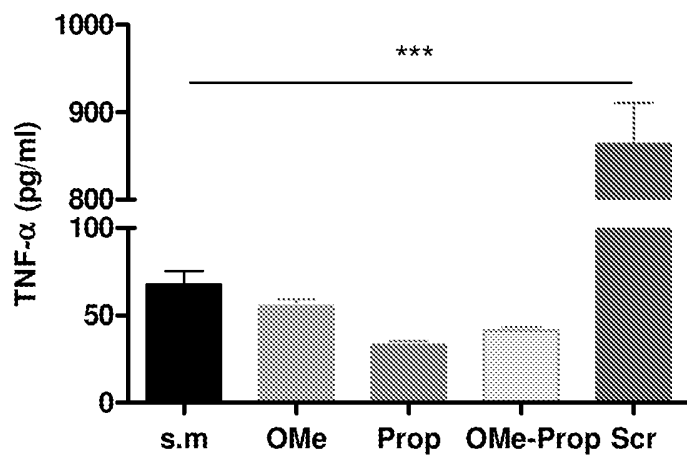
38.- Uso según la reivindicación anterior para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

39.- Uso según la reivindicación anterior para el tratamiento de una enfermedad que se selecciona de la lista que comprende: enfermedad del intestino inflamado, artritis reumatoide, osteoartritis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

40.- Uso según la reivindicación anterior donde la enfermedad inflamatoria es la enfermedad del intestino inflamado.

1/7

FIG. 1A



B

FIG 1B

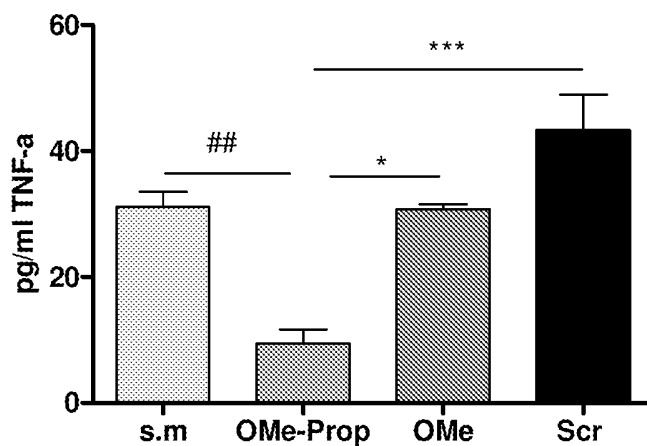


FIG 1C

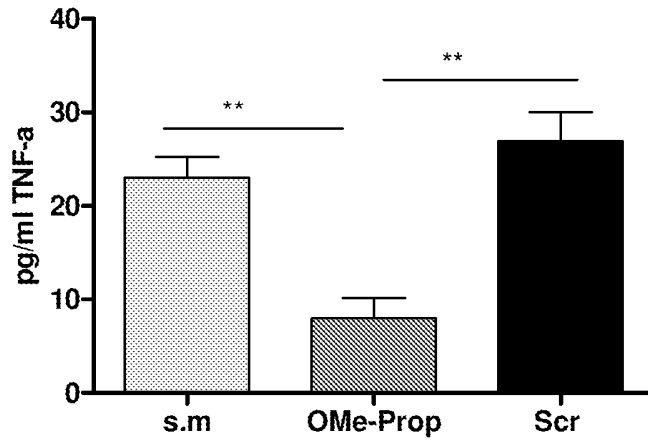


FIG 2.

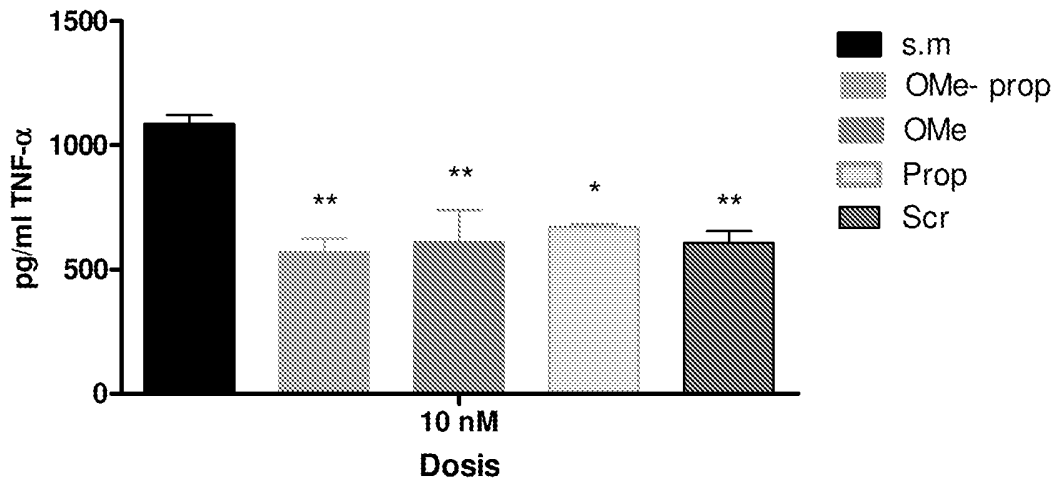
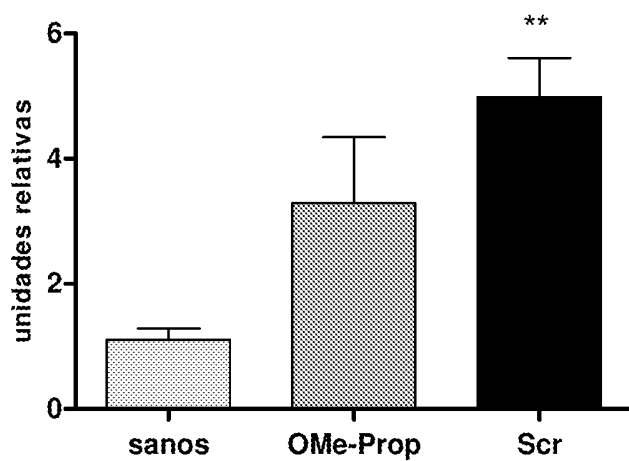


FIG 3



4/7

FIG 4A

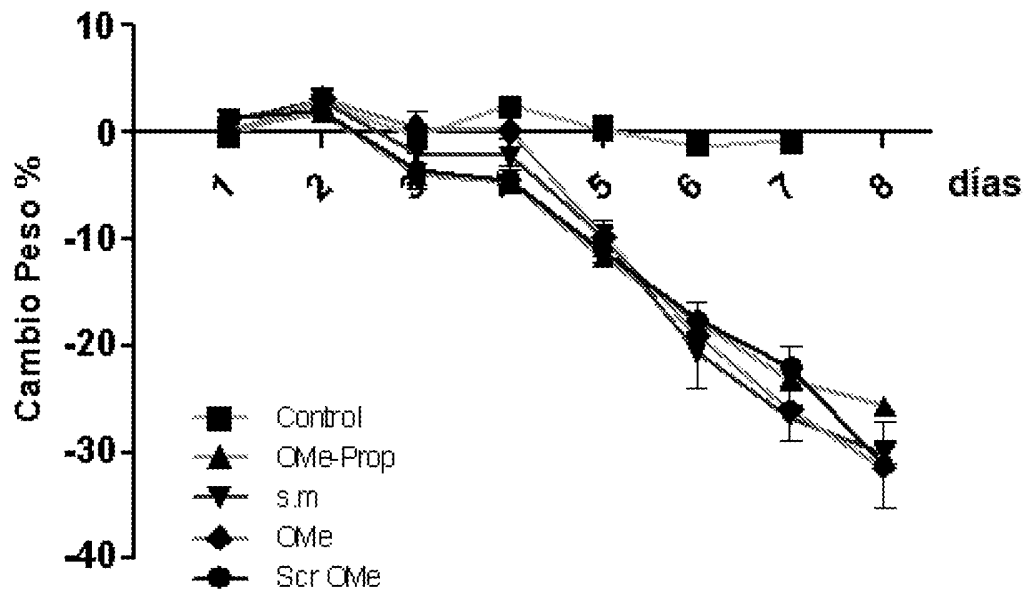
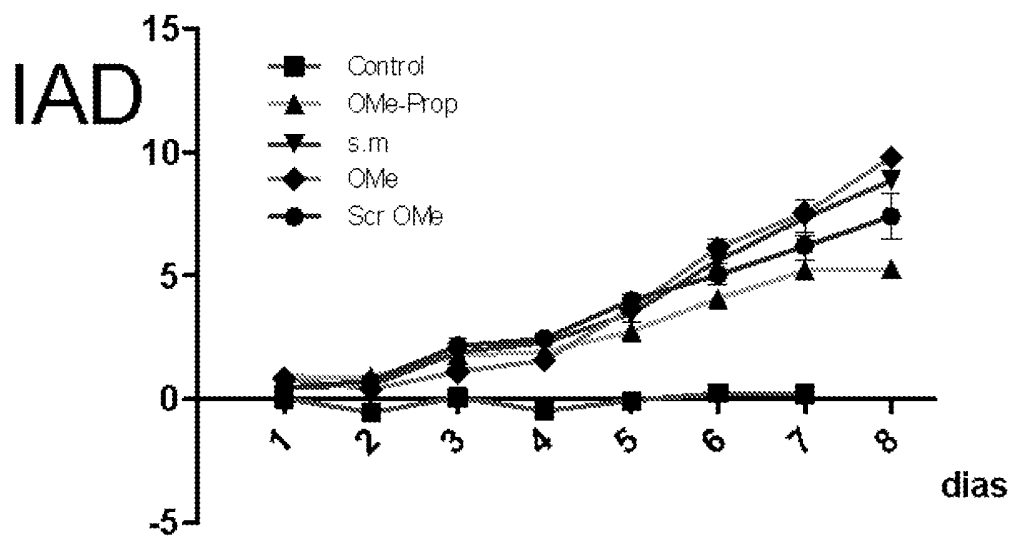


FIG 4B



5/7

FIG 4C

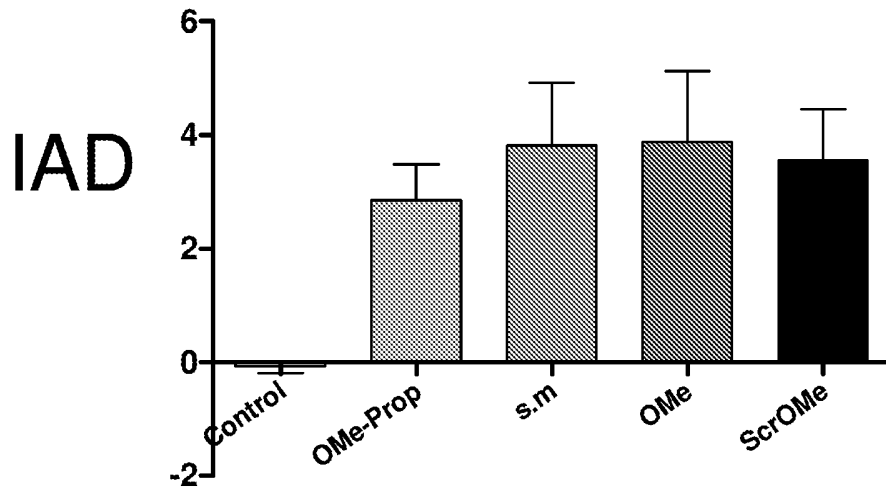
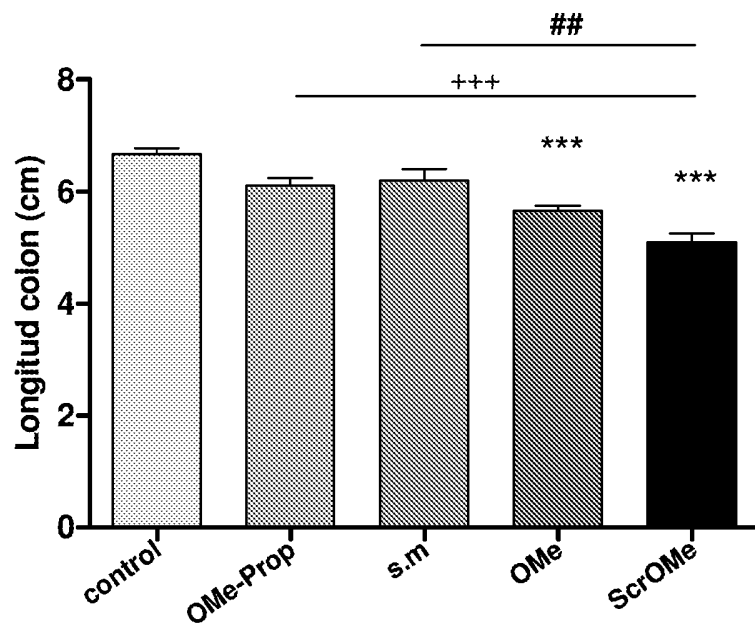


FIG 4 D



6/7

FIG 4 E

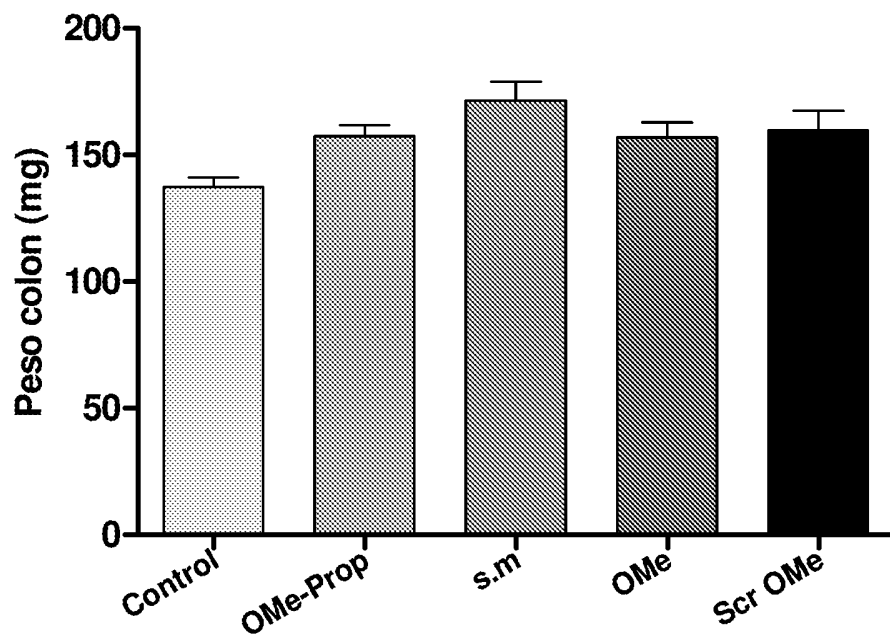
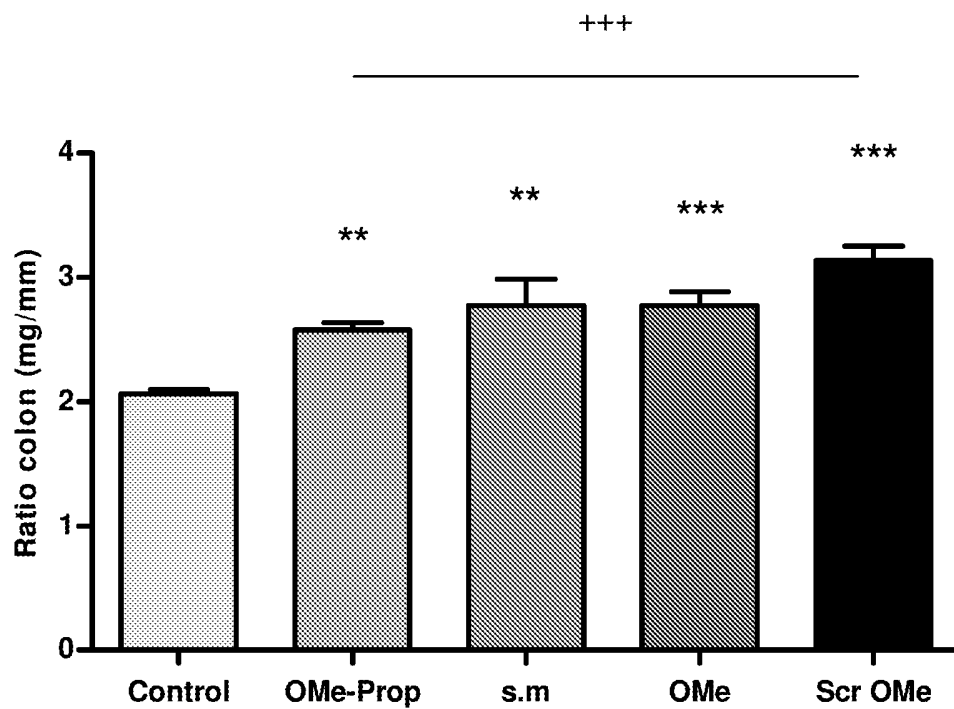
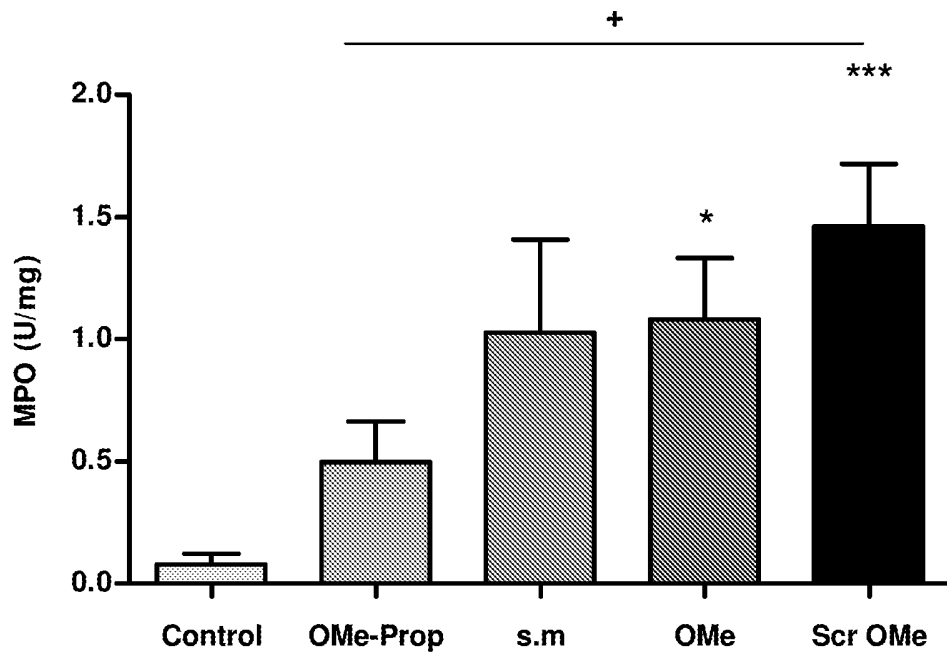


FIG 4 F



7/7

FIG 4G



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07H, C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBLall, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, NPL, COMPNDX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SORENSEN, D. R., LEIRDAL, M., SIOUD, M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. <i>Journal of Molecular Biology</i> . April 2003, Vol. 327, N° 4, pages 761-766. ISSN 0022-2836. <DOI:10.1016/S0022-2836(03)00181-5>	1-5, 21-35, 37, 38
A	ZHANG, Y., CRISTOFARO, P., SILBERMANN, R. et al. Engineering mucosal RNA interference <i>in vivo</i> . <i>Molecular Therapy</i> . September 2006, Vol. 14, N° 3, pages 336 - 342. ISSN 1525-0016. <DOI:10.1016/j.ymthe.2006.04.001>	1-5, 21-35, 37-40
A	WO 2007/051303 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC.) 10.05.2007, paragraphs [0002 - 0007]; paragraph [0018]; paragraph [0020]; paragraph [0078]; examples 1 - 4.	1, 18-24, 29-35, 37

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
14/02/2012

Date of mailing of the international search report
(06/03/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
E. Relaño Reyes

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070740

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JUDGE, A. D., BOLA, G., LEE, A. C. H., MACLACHLAN, I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing <i>in vivo</i> . Molecular Therapy. March 2006, Vol. 13, N° 3, pages 494 - 505. ISSN 1525-0016. <DOI:10.1016/j.ymthe.2005.11.002>	1, 18-20, 29-35, 37
A	HERDEWIJN, P. Antisense oligonucleotides as anticancer agents. In: Cancer Research Supported under Miomed 1. Biomedical and Health Research. 1998. Edited by S.S. Baig. Amsterdam: IOS Press. ISBN 90 5199 410 9. In particular pages 182-189.	1, 6-8, 17, 29-31, 37
A	HERDEWIJN, P. Antisense oligonucleotides. Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België. 1996, Vol. 58, N° 4, pages 359-381. (abstract) MEDLINE Database (on line) [retrieved on 13.02.2012] Retrieved from: EPOQUE. Accession Number: NLM8956554.	1, 6-8, 17, 29-31, 37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070740

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 1-5, 21-27, 37 (parcialmente); 9-16 (totalmente)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 1-5 and 21-27 are not clear (PCT Article 6) because the siRNA should be defined in terms of its sequence. Consequently, the search has been carried out for a siRNA with a passenger strand having the sequence of SEQ. ID. NO. 1 and a guide strand of SEQ. ID. NO. 5.
Claim 37 is confusing (PCT Article 6) because a pharmaceutical composition per se is a medicament. Consequently, this option has not been taken into account during the search.
Claim 1 is not sufficiently supported by the description (PCT Article 6) because it cannot be deduced from the description that all the R radicals included in this claim allow the siRNA to maintain its activity. Consequently, the search has been carried out for a C1-C6 alkyl substituted with at least one -OH group linked by a phosphodiester link to position 3'.
Claims 9-16 are not supported by the description (PCT Article 6) because the production of a siRNA with biological activity and including these radicals cannot be deduced from the information in the present application.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070740

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007/051303 A1	10.05.2007	CA 2628300 A1 AU 2006308765 A US 2007135372 A1 US 8101741 B2 EP 1948674 A1 CN 101346393 A JP 2009513151 A US 2009270481 A1 EP 2395012 A2	10.05.2007 10.05.2007 14.06.2007 24.01.2012 30.07.2008 14.01.2009 02.04.2009 29.10.2009 14.12.2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070740

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H21/02 (2006.01)

C12N15/28 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070740

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, C12N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBLall, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, NPL, COMPNDX, INSPEC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SORENSEN, D. R., LEIRDAL, M., SIOUD, M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. <i>Journal of Molecular Biology</i> . Abril 2003, Vol. 327, Nº 4, páginas 761-766. ISSN 0022-2836. <DOI:10.1016/S0022-2836(03)00181-5>	1-5, 21-35, 37, 38
A	ZHANG, Y., CRISTOFARO, P., SILBERMANN, R. et al. Engineering mucosal RNA interference <i>in vivo</i> . <i>Molecular Therapy</i> . Septiembre 2006, Vol. 14, Nº 3, páginas 336 - 342. ISSN 1525-0016. <DOI:10.1016/j.ymthe.2006.04.001>	1-5, 21-35, 37-40
A	WO 2007/051303 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC.) 10.05.2007, párrafos [0002 - 0007]; párrafo [0018]; párrafo [0020]; párrafo [0078]; ejemplos 1 - 4.	1, 18-24, 29-35, 37

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
14/02/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
06 de marzo de 2012 (06/03/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
E. Relaño Reyes

Nº de teléfono 91 3498504

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070740

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	JUDGE, A. D., BOLA, G., LEE, A. C. H., MACLACHLAN, I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing <i>in vivo</i> . Molecular Therapy. Marzo 2006, Vol. 13, Nº 3, páginas 494 - 505. ISSN 1525-0016. <DOI:10.1016/j.ymthe.2005.11.002>	1, 18-20, 29-35, 37
A	HERDEWIJN, P. Antisense oligonucleotides as anticancer agents. En: Cancer Research Supported under Miomed 1. Biomedical and Health Research. 1998. Editado por S.S. Baig. Amsterdam: IOS Press. ISBN 90 5199 410 9. En particular páginas 182-189.	1, 6-8, 17, 29-31, 37
A	HERDEWIJN, P. Antisense oligonucleotides. Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België. 1996, Vol. 58, Nº 4, páginas 359-381. (resumen) Base de datos MEDLINE (en línea) [recuperado el 13.02.2012] Recuperado de: EPOQUE. Número de acceso: NLM8956554.	1, 6-8, 17, 29-31, 37

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070740

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

- Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
- Las reivindicaciones n°s: **1-5, 21-27, 37 (parcialmente); 9-16 (totalmente)**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
Las reivindicaciones 1-5, 21-27 no son claras (Art. 6 PCT), ya que el pARNi ha de definirse por su secuencia. Por lo tanto, se ha buscado un pARNi cuya cadena acompañante tenga la secuencia SEQ. ID. NO. 1 y la cadena guía la SEQ. ID. NO. 5.
La reivindicación 37 resulta confusa (Art. 6 PCT), ya que una composición farmacéutica es en sí un medicamento. Por lo tanto, no se ha tenido en cuenta esta opción en la búsqueda.
La reivindicación 1 no está fundada adecuadamente en la descripción (Art. 6 PCT). Esto es debido a que de la descripción no se deduce que todos los radicales R incluidos en esta reivindicación permitan al pARNi mantener su actividad. En consecuencia, se ha buscado un alquilo C₁-C₆ sustituido con al menos un grupo -OH, unido mediante enlace fosfodiéster a la posición 3'.
Las reivindicaciones de la 9-16 no están fundadas en la descripción (Art. 6 PCT), ya que de los datos de la presente solicitud, no se deduce la obtención de pARNi con actividad biológica que incluyan estos radicales.
- Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

- Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
- Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
- Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
- Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070740

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2007/051303 A1	10.05.2007	CA 2628300 A1	10.05.2007
		AU 2006308765 A	10.05.2007
		US 2007135372 A1	14.06.2007
		US 8101741 B2	24.01.2012
		EP 1948674 A1	30.07.2008
		CN 101346393 A	14.01.2009
		JP 2009513151 A	02.04.2009
		US 2009270481 A1	29.10.2009
		EP 2395012 A2	14.12.2011
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07H21/02 (2006.01)

C12N15/28 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)