



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 566**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04803067 .0**
96 Fecha de presentación : **23.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1706489**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54 Título: **Compuestos oligoméricos para la modulación de Bcl-2.**

30 Prioridad: **23.12.2003 DK 2003 01929**
23.12.2003 US 532844 P
31.03.2004 DK 2004 00517
31.03.2004 US 558392 P
07.07.2004 DK 2004 01069
07.07.2004 US 586340 P
22.10.2004 DK 2004 01629
22.10.2004 US 621594 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.08.2010

73 Titular/es: **Santaris Pharma A/S**
Kogle Allé 6
2970 Hörsholm, DK

72 Inventor/es: **Frieden, Miriam;**
Hansen, Jens, Bo;
Orum, Henrik;
Westergaard, Majken y
Thruue, Charlotte, Albeck

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 344 566 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 oligoméricos para la modulación de Bcl-2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona mejores compuestos oligoméricos y procedimientos para modular la expresión del gen Bcl-2 en seres humanos. En particular, la presente invención se refiere a un compuesto oligomérico que consta de la secuencia C_sT_sC_sC_sC_sA_sC_sG_sT_sG_sC_sG_sC_sC_sA (SEC ID N° 15), en la que las letras en mayúscula designan los nucleótidos LNA, las letras minúsculas designan los nucleótidos de AND, el subíndice “s” designa que los nucleótidos adyacentes están unidos por un grupo fosforotioato y en la que todos los monómeros LNA-C son metil-C.

Por tanto, la presente invención se refiere a un compuesto oligomérico antisentido dirigido contra ARNm humano de Bcl-2 y que es capaz de modular la biosíntesis de la proteína Bc-2 humana. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto oligomérico, a usos de la misma y a procedimientos de tratamiento y diagnóstico que utilizan dicho compuesto oligomérico.

Antecedentes de la invención

La proteína Bcl-2 humana, que está estrechamente asociada con el proceso de la muerte celular programada (apoptosis). La apoptosis es un proceso fisiológico activo estrechamente regulado implicado en el desarrollo, el recambio celular normal y la atrofia tisular inducida por hormonas. La ausencia de muerte celular programada desempeña un papel importante en el cáncer u otras enfermedades hiperproliferativas como reestenosis, fibrosis, psoriasis o ciertos tipos de enfermedades alérgicas, en particular la progresión tumoral y, de forma importante, podría contribuir al problema clínico de la resistencia a regímenes antineoplásicos, en particular a compuestos quimioterapéuticos estándar concretos. En contraste con la mayoría de los tejidos normales, en los tumores malignos, como el cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y el cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), a menudo se produce co-expresión de Bcl-2.

El documento WO 95/08350 desvela oligómeros anticódigo y procedimientos para usarlos para controlar el crecimiento de células cancerosas que expresan en gen Bcl-2.

Klasa y col., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 12: 193-213 (2002) (revisión), tratan los efectos biológicos del compuesto oblimersen sódico (G3139) y su potencial como fármaco antisentido. El compuesto tiene la estructura 5'-d(P-tio)TCT-CCC-AGC-GTG-CGC-CAT-3'. Genta Incorporated presentó a la FDA un NDA para oblimersen sódico (G3139) más dacarbazina (DTIC). Se basó en un estudio de fase 3 internacional, multicéntrico, aleatorizado de oblimersen sódico (G3139) más dacarbazina (DTIC) frente a DTIC solo cada tres semanas como quimioterapia de primera línea para el melanoma metastásico. En mayo de 2004, se comunicó que el estudio no mostraba un beneficio para la supervivencia con la combinación de G3139 más DTIC. La rama tratada con la combinación se asoció con un incremento de la toxicidad y retiradas debido a acontecimientos adversos (AA), incluidos 69 (18,6%) pacientes que suspendieron la terapia por acontecimientos adversos en la rama de tratamiento con G3139 frente a 39 (10,8%) en la rama tratada con DTIC solo. El índice de acontecimientos adversos graves, AAG, fue 40% en la rama de tratamiento con G3139 frente a 27% en la rama de tratamiento con DTIC solo. Dado que la dosificación de DTIC fue idéntica en las dos ramas, era probable que los incrementos de toxicidad se debieran a la adición de G3139. La supervivencia no mejoró ya aumentó la toxicidad. Posteriormente se retiró el NDA. No obstante, el análisis del promotor de criterios de valoración secundarios sí mostró un beneficio estadísticamente significativo en la supervivencia sin progresión desde una mediana de 49 días con DTIC a 74 días con la combinación, una diferencia de 25 días (p= 0,0003, HR= 0,73). Asimismo, el promotor comunicó una diferencia significativa en la tasa de respuestas del 6,8% para DTIC solo frente a 11,7% para la combinación (p= 0,019). El hecho de que oblimersen sódico cumpla el criterio de valoración secundario indica que podrían haber sido un compuesto eficaz para el Tratamiento del melanoma metastásico. La mayor toxicidad, la selección del criterio de valoración principal y el diseño global del estudio clínico, todos ellos fueron factores que contribuyeron al fracaso.

En una tesis doctoral defendida por Jan Stenvang Jepsen (mayo de 2003, Universidad de Copenhague) se estudiaron oligonucleótidos que contienen LNA dirigidos a los 6 primeros codones del ARNm humano de Bcl-2. Las secuencias LNA fosfodiéster (PO) completamente modificadas, headmer de fosforodiéster (LNA/PO en el extremo 5' y ADN/PS fosforotioato en el extremo 3'), gapmer de fosforodiéster completos (tamaños de los huecos de 8, 10, 12, 14) y gapmer con violación exclusiva en el hueco (tamaños de los huecos de 8, 10, 12, 14) se analizaron según la captación *in vitro* con diferentes agentes de transfección y según la regulación por disminución de la proteína Bcl-2. El estudio de captación se realizó en células MCF-7 y los resultados se analizaron mediante microscopía y citometría de flujo. Se obtuvo una liberación igualmente eficiente para todos los constructos que contienen diferentes PO y PO/PS. Aunque se han estudiado diversos oligonucleótidos y constructos que contienen LNA, Stenvang Jepsen no divulgó o anticipó gapmer de oligonucleótidos que contienen LNA en los que un número sustancial de los enlaces nucleotídico en el dominio de unión a la diana, incluidos los flancos de LNA, incluidos los lados de LNA, eran grupos fosforotioato (-O-P(O,S)-O-), probablemente porque se sabía que la fosforotiolación causaría una reducción de la afinidad y porque no se identificaron problemas de estabilidad.

ES 2 344 566 T3

Frieden y col., Nucleic Acid Research, 2003, Vol. 31, N° 21, 6365-6373 y el documento WO 2004/046160 A2 desvelan varias consideraciones con respecto al diseño de oligonucleótidos antisentido sobre la base de los experimentos *in vitro*.

5 Fluiter y col., Nucleic Acid Research, 2003, Vol. 3, 953-962, desvelan estudios de biodistribución e inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* de los oligonucleótidos antisentido LNA. Zangemeister-Wittke, Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1002, diciembre 2003, pág. 90-94, describe un oligonucleótido antisentido modificado con LNA complementario al gen bcl-2 humano. La región objetivo es diferente de la región objetivo del oligonucleótido de acuerdo con la presente invención.

10 Zangemeister-Wittke, y col., Clinical Cancer Research, vol. 6. n° 6, 2000, pág. 2547-2555, describen la secuencia del oligonucleótido en la referencia anterior.

15 Mologni L y col., Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 264, n° 2, 1999, pág. 537-543, divulga un oligonucleótido antisentido dirigido al sitio de inicio de la traducción de Bcl-2. No se realiza ninguna mención al LNA.

Breve descripción de la invención

20 En vista de lo anterior, y en particular de los problemas de potencia relacionados con el compuesto oblimersen sódico, sigue habiendo la necesidad de mejores compuestos oligoméricos para regular por disminución la Bcl-2. Preferentemente, dicho compuesto tendría un perfil *in vivo* adecuado con respecto a la distribución y la regulación por disminución de Bcl-2 y, por tanto, la relevancia terapéutica en relación con diversas afecciones relacionadas con Bcl-2, en particular cáncer.

Habiéndose dicho esto, actualmente los presentes inventores han encontrado que ciertos compuestos oligoméricos nuevos de LNA del tipo gapmer exhiben efectos biológicos comparables o potenciados en comparación con oblimersen sódico, aunque no se monitorizaron acontecimientos adversos a dosis farmacológicas relevantes.

30 Más específicamente, los presentes inventores han encontrado que un compuesto oligomérico que consta de la secuencia C_sT_sC_sC_sC_sA_sC_sG_sT_sG_sC_sG_sC_sC_sA (SEC ID N° 15), en la que las letras en mayúscula designan los nucleótidos LNA, las letras minúsculas designan los nucleótidos de AND, el subíndice "S" designa que los nucleótidos adyacentes están unidos por un grupo fosforotioato y en la que todos los monómeros LNA-C son metil-C, tiene propiedades biológicas interesantes.

Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 muestra la regulación por disminución de Bcl-2 en células 15PC3 transfeccionadas con compuestos oligoméricos de LNA analizados mediante transferencia de tipo western. Las SEQ ID N°: 2, 4, 15, 21 y 24 (véase la Tabla 1) fueron inhibidores más potentes de Bcl-2 medidos a niveles proteicos en comparación con oblimersen sódico, es decir la SEC ID N1 56 (referencia). La proteína survivina sirvió como control.

45 La figura 2A muestra la regulación por disminución de Bcl-2 en células 15PC3 transfeccionadas con compuestos oligoméricos de LNA analizados mediante transferencia de tipo western y visualizados usando un sistema de detección mediante quimioluminiscencia. La SEQ ID N°: 2 fue significativamente más potente que la SEC ID N° 56 (preferencia). La proteína survivina sirvió como control.

50 La figura 2B muestra una transferencia de tipo western. Células 518A2 se sometieron a lipofección con la SEC ID N° 56 (referencia) 5 nM, la SEC ID N° 8 y la SEC ID N° 15, respectivamente. La proteína se analizó tras 48 horas. La SEC ID N° 15 permanece activa a lo largo de este ciclo de tiempo. El gráfico muestra los datos cuando se normalizan respecto a tubulina.

55 La figura 2C muestra una transferencia de tipo western. Las células 518A2 se sometieron a lipofección con 5 nM de las SEC ID N° 56, SEC ID N° 8, SEC ID N° 15 y SEC ID N° 35, respectivamente, que es la versión 15-mer n-1 de la Sec N° 15. La proteína se analizó a 48 horas. La SEQ ID N°: 35 fue tan potente como la SEC ID N°: 15. Los datos se normalizaron a la tubulina.

60 La figura 3A muestra la inducción de apoptosis medida mediante la actividad de la caspasa 3/7 por el compuesto que contiene LNA en células 518A2 tras 24, 48 y 72 horas. Las secuencias oligoméricas de LNA SEC ID N°: 2, 4, 12, 15, 21, 24 y 57 indujeron apoptosis con mayor eficiencia que la SEC ID N°: 56 (referencia) y el correspondiente compuesto metilado en citosina denominado SEC ID N° 59. Los valores menores de caspasa 3/7 en los últimos puntos de tiempo (p. ej., a 72 horas) se deben a muerte celular por apoptosis a una activación más temprana de la caspasa 3/7. Por tanto, se ha alcanzado la activación máxima antes del momento de la monitorización.

65 La figura 3B muestra la inducción de apoptosis medida mediante la actividad de la caspasa 3/7 por el compuesto que contiene LNA en células 518A2 tras 13, 24, 48 y 72 horas. Los compuestos oligoméricos de LNA SEC ID N°: 8, 9,

ES 2 344 566 T3

15 y 16 indujeron apoptosis con mayor eficiencia en comparación con una SEC ID N° 58, es decir un oligonucleótido control de la polaridad inversa que también contiene LNA.

5 La figura 3C muestra la inducción de la etapa celular apoptótica tardía medida mediante análisis por citometría de flujo con anexina V-FITC. Las células HeLa tratadas con el compuesto oligomérico LNA de SEC ID N° 15 se clasificaron como más “apoptóticas tardías” o “dañadas” en comparación con las células tratadas de forma simulada y con la SEC ID N° 56 (referencia).

10 La figura 3D muestra el tratamiento de células con las SEC ID N° 8 y la SEC ID N° 15 5 nM y 12,5 nM que conduce a la inducción de apoptosis en estadio precoz y tardío medida mediante análisis de citometría de flujo con anexina V-FITC en comparación con células tratadas de forma simulada.

15 La figura 4 muestra la inhibición de Bcl-2 en células cancerosas en proliferación (ensayos MTS), células 518A2, medida 48 horas después del tratamiento con el compuesto oligomérico de LNA de Bcl-2. Las SEQ ID N°: 2, 4, 12, 15, 21, 24 y 57 fueron todos inhibidores más potentes de la proliferación en comparación con la SEC ID N° 56 (referencia) y el correspondiente compuesto metilado en citosina denominado SEC ID N° 59 (referencia). Los datos se ajustaron a un control tratado de forma simulada. El experimento 1 y el experimento 2 representan dos experimentos distintos.

20 La figura 5 muestra la inhibición de Bcl-2 en células cancerosas en proliferación, células 518A2, medida en un curso de tiempo de 0-48 horas después del tratamiento con el compuesto oligomérico de LNA de Bcl-2. Las SEQ ID N°: 2, 4, 12, 15, 21, 24 y 57 fueron todos inhibidores más potentes de la proliferación en comparación con la SEC ID N° 56 (referencia) y el correspondiente compuesto metilado en citosina denominado SEC ID N° 59 (referencia). Los datos se ajustaron a un control tratado de forma simulada.

25 La figura 6 muestra una transferencia de tipo western. Células 518A2 se sometieron a lipofección con la SEC ID N° 56 (referencia) y la SEC ID N° 15, respectivamente. Se analizaron las proteínas a 24 horas, 48 horas y 72 horas. La SEC ID N° 15 permanece activada a lo largo de su ciclo de tiempo. A las 24 horas, la proteína Bcl-2 todavía sigue visible debido a la duración de la semivida de la proteína.

30 La figura 7A muestra una eficaz reducción *in vivo* del volumen tumoral usando la SEC ID N° 15 en comparación con la SEC ID N° 59 (referencia) en un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos atímicos PC3 de próstata. Los compuestos se administraron por vía i.p. a 10 mg/kg durante 14 días. Como control positivo se usó mitomicina C a 2 mg/kg administrados por vía i.p. durante 14 días. El crecimiento tumoral se monitorizó durante 8 días adicionales después del tratamiento.

35 La figura 7B muestra que no había ninguna pérdida significativa de peso corporal cuando se administra la SEC ID N° 15 en un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos atímicos PC3 de próstata. La SEC ID N° 56 (referencia) a 10 mg/kg y el control positivo mitomicina C a 2 mg/kg mostraron un patrón similar.

40 Figura 7C muestra una eficaz reducción *in vivo* del volumen tumoral usando la SEC ID N° 8 en comparación con el control salino en un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos atímicos PC3 de próstata. Los compuestos se administraron por vía i.p. a 10 mg/kg durante 14 días (Día 5-19).

45 La figura 7D muestra una eficaz reducción *in vivo* del volumen tumoral usando la SEC ID N° 15 administrada diariamente los días 7-15 o los días, 11, 13, 15, 18, 20 en comparación con el control salino en modelo de xenoinjerto en ratones desnudos atímicos PC3 de próstata. Los compuestos se administraron por vía i.p. a 10 mg/kg durante 14 días. El crecimiento tumoral se monitorizó durante 8 días adicionales después del tratamiento.

50 La figura 8A muestra una reducción comparable *in vivo* del peso del tumor (gramos) administrando 1,75 mg/kg durante 14 días por vía i.p. en un modelo de xenoinjerto en ratones de melanoma 518A2 scid de la SEC ID N° 15 en comparación con una dosis 4 veces mayor de la SEC ID N° 56 (referencia).

55 La figura 8B muestra los resultados del mismo experimento que la figura 8A, pero los resultados se presentan en forma del % de reducción del tumor y no en gramos.

60 La figura 9 muestra una reducción *in vivo* comparable del volumen tumoral cuando se administran 1,75 mg/kg de la SEC ID N° 15 por vía i.p. durante 14 días en un modelo de xenoinjerto en ratones de melanoma 518A2 scid en comparación con una dosis 4 veces mayor de la SEC ID N° 56 (referencia).

65 La figura 10A no muestra ningún incremento en el tamaño del hígado cuando se administran 1,75 mg/kg de la SEC ID N° 15 por vía i.p. durante 14 días en xenoinjerto en ratones de melanoma 518A2 scid en comparación con el control salino. La SEC ID N° 56 (referencia) a 7 mg/kg dio un incremento del tamaño del hígado.

La figura 10B no muestra ningún incremento en el tamaño del bazo cuando se administran 1,75 mg/kg de la SEC ID N° 15 por vía i.p. durante 14 días en xenoinjerto en ratones de melanoma 518A2 scid en comparación con el control salino. La SEC ID N° 56 (referencia) a 7 mg/kg presentó un incremento del tamaño del bazo. Esto indica que la SEC ID N° 15 tiene un menor nivel de toxicidad a una dosis activa en comparación con la SEC ID N° 56 (referencia).

ES 2 344 566 T3

La figura 10C muestra que el tratamiento no condujo a una pérdida de peso corporal del ratón cuando se administran 1,75 mg/kg de la SEC ID N° 15 por vía i.p. durante 14 días en xenoinjerto en ratones de melanoma 518A2 scid en comparación con el control salino y la SEC ID N° 56 (referencia) a 7 mg/kg. Esto indica que la SEC ID N° 15 tiene un menor nivel de toxicidad a una dosis activa en comparación con la SEC ID N° 56 (referencia).

La figura 11 muestra una mejor reducción *in vivo* del peso tumoral en un modelo de xenoinjerto en ratones de melanoma 518A2 scid cuando se administran 7 mg/kg de la SEC ID N° 8 por vía i.p. durante 14 días y en comparación con la misma dosis de la SEC ID N° 56 (referencia). La SEQ ID N°: 8 muestra una actividad antitumoral igual cuando se administra una dosis 7 veces menor que la SEC ID N° 56 (referencia).

La figura 12A muestra un incremento de la estabilidad de las SEC ID N° 15, 16 Y 20 en plasma de rata (machos NtacSD, Li-Heparine (Taconic, M&B)) en comparación con la SEC ID N° 56 (referencia). Los oligonucleótidos se incubaron a concentraciones de 20 μ M a 37°C durante 0, 4, 24 y 48 horas, respectivamente. El único fragmento de degradación presente en la muestra es el oligonucleótido n-1 correspondiente (15mer) que carece del residuo de ADN en el extremo 3'. No se pueden detectar otros fragmentos de degradación incluso tras una digestión de 48 horas.

La figura 12B muestra que las SEC ID N° 9 y 9 exhiben una elevada estabilidad en plasma de rata en comparación con la SEC ID N° 56 (referencia). Los oligonucleótidos se incubaron a concentraciones de 20 μ M a 37°C durante 0, 4, 24 y 48 horas, respectivamente. El único fragmento de degradación presente en la muestra es el oligonucleótido n-1 correspondiente (15mer) que carece del residuo de ADN en el extremo 3'. No se pueden detectar otros fragmentos de degradación incluso tras una digestión de 48 horas.

La figura 13 muestra niveles de la SEC ID N° 15 en hígado y riñón de ratones NMRI tras una única dosis administrada i.v. (25 mg/kg). Se ha encontrado que la semivida ($T_{1/2}$) del compuesto activo de SEC ID N° 15 es de aproximadamente 3 días tanto en hígado como en riñón. Esto implica que los regímenes de dosificación de dosis biológicas óptimas de la SEC ID N° 15 podrían ser menos frecuentes que la infusión continua y la dosificación diaria.

Descripción de la invención

Como se ha mencionado en lo que antecede, los presentes inventores han encontrado que un compuesto oligomérico que consta de la secuencia $C_s T_s C_s C_s C_s a_s a_s C_s g_s t_s g_s C_s C_s C_s a$ (SEC ID N° 15), en la que las letras en mayúscula designan los nucleótidos LNA, las letras minúsculas designan los nucleótidos de AND, el subíndice "S" designa que los nucleótidos adyacentes están unidos por un grupo fosforotioato y en la que todos los monómeros LNA-C son metil-C, tiene propiedades biológicas interesantes.

Genéricamente, se cree que el compuesto oligomérico definido en la presente memoria descriptiva posee mejores propiedades en comparación con los compuestos oligoméricos conocidos. Con la expresión "mejores propiedades" se entiende uno o más parámetros por los cuales los compuestos oligoméricos muestran un rendimiento global mejor o igual en comparación con sus homólogos de fosforotioato.

Ejemplos de dichos parámetros mejorados son la mayor vida de almacenamiento del fármaco, una constante de unión a la diana más elevada (complemento intermedio en el compuesto oligomérico o el ARNm diana), buena resistencia a las nucleasas extra e intracelulares, mayor potencia del modo de acción, mejor respuesta fenotípica, efectos de mayor duración, mejor quimiosensibilización y mejora de la comodidad para el paciente. Ejemplos de parámetros iguales son la facilidad de producción, facilidad para la formulación farmacéutica, la distribución tisular, buen perfil de seguridad.

En resumen, el compuesto oligomérico definido en la presente memoria descriptiva presenta valores de CI_{50} en el intervalo nanomolar muy bajo (5 nM) con respecto a la regulación por disminución del ARNm de Bcl-2 con respecto a la regulación por disminución de la proteína (la proporción Bcl2/Bax ha cambiado desde 1 nM) e inhibición de la proliferación celular. Niveles muy superiores a los observados para oblimersen y para los compuestos de Jepsen (a 400 nM se pueden observar niveles significativos de regulación por disminución). Además, la muerte celular se correlaciona fuertemente con la inducción de la apoptosis y los niveles de inducción de apoptosis mostrados son muy superiores a los de oblimersen. Además, el compuesto oligomérico definido en la presente memoria descriptiva muestra una estabilidad en plasma de rata considerablemente aumentada y una semivida más prolongada en tejido en comparación con oblimersen. Se observó una respuesta antitumoral repetida en un modelo de próstata y de melanoma; respuesta uniforme a 1 mg/kg/día. Además, también se observó respuesta antitumoral con dosificación menos frecuente del compuesto en comparación con la dosificación habitual descrita en la literatura para oblimersen. No se monitorizaron acontecimientos adversos a dosis farmacológicas relevantes, tales como elevación de ASAT, ALAR. Los hallazgos de los inventores superan los constructos de Jepsen para los que no se analizó la respuesta funcional, la estabilidad, la semivida tisular, la respuesta *in vivo*, la química clínica o la biodistribución.

Se puede acceder a la secuencia del ARNm de Bcl-2 humano a la que se hace referencia en la presente memoria descriptiva en la base de datos GenBank como HUMBcl2A con el número de registro M13994. Dentro del contexto de la presente solicitud, la numeración de ácidos nucleicos, en particular del ARNm o de las secuencias de ADNc correspondientes, se refiere a la numeración respectiva del ARNm de Bcl-2 humano tal como está contenida en dicha base de datos con dicho número de registro. A partir de la secuencia de ARNm se puede deducir una secuencia de

ES 2 344 566 T3

ADNc correspondiente mediante, en concreto, intercambio de cualquier base T de la secuencia de ADNc por una base U en la secuencia de ARNm y viceversa.

5 *Los compuestos oligoméricos*

El compuesto oligomérico *se caracteriza porque* el dominio de unión a la diana comprende al menos dos nucleótidos LNA o nucleótidos análogos de LNA unidos por un grupo fosforotioato.

10 Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “dominio de unión a la diana” se refiere a un dominio de un compuesto oligomérico (o incluso el compuesto oligomérico como tal) que se une a una secuencia diana especificada, en el presente documento una región que varía desde la posición de la base nº 1459 (5') a la nº 1476 (3') del ARNm de Bcl-2 humana.

15 En una forma de realización, el dominio de unión a la diana comprende al menos dos nucleótidos LNA unidos por un grupo fosforotioato (O-P(O,S)-O-).

En otra forma de realización, el dominio de unión a la diana comprende al menos dos nucleótidos análogos LNA unidos por un grupo fosforotioato (O-P(O,S)-O-).

20 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “compuestos oligoméricos” se refiere a oligonucleótidos LNA, es decir ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) modificado mediante la sustitución de uno o más (o todos) nucleótidos en ellos por nucleótidos LNA o nucleótidos LNA, en particular al menos dos nucleótidos LNA con la posible sustitución adicional de nucleótidos por nucleótidos análogos LNA y derivados/análogos nucleotídicos.

El término “oligonucleótido” incluye oligonucleótidos compuestos por bases nucleotídicas naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos (estructura), así como oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de modo similar o con mejores funciones específicas.

30 El compuesto oligomérico que se va a usar en el contexto de la presente invención tiene una longitud de 16 bases nucleotídicas.

35 La expresión “longitud de bases nucleotídicas” se refiere a la longitud en términos del número de bases nucleotídicas tras hibridación a una molécula de ácido nucleico lineal complementaria, es decir el número total de bases nucleotídicas del ácido nucleico complementario en la región con la que se hibrida el compuesto oligomérico. Por tanto, la longitud del compuesto oligomérico incluye cualquier nucleótido intermedio en el que una base nucleotídica está ausente.

40 En una forma de realización preferente, los compuestos oligoméricos (oligonucleótidos LNA) de la invención comprenden al menos dos nucleótidos LNA.

En otra forma de realización, los compuestos oligoméricos (oligonucleótidos LNA) de la invención comprenden al menos dos nucleótidos análogos LNA y, posiblemente, uno o más nucleótidos LNA.

45 El término “al menos dos” comprende los números enteros mayores o iguales a 2, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13,14,15,16, 17 y así sucesivamente.

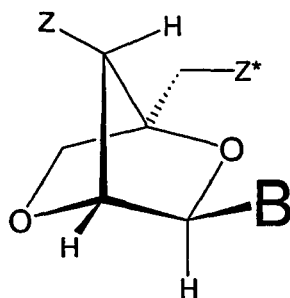
50 El término “al menos uno” comprende los números enteros mayores o iguales a 1, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13,14,15,16,17 y así sucesivamente.

Con el término “a” como se usa sobre un análogo nucleosídico, una SEC ID N° etc. se pretende decir uno o más. En particular, con la expresión “un componente (tal como un nucleósido, un análogo nucleosídico, una SEC ID N° o similares) seleccionado del grupo constituido por...” se pretende decir que se puede seleccionar uno o más de los componentes citados. Por tanto, expresiones como “un componente seleccionado del grupo constituido por A, B y C” se pretende que incluyan todas las combinación de A, B y C, es decir A, B, C, A+B, A+C, B+C y A + B + C.

60 El término “LNA” (ácido nucleico bloqueado) (u “oligonucleótido LNA”) se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más análogos nucleosídicos bicíclicos también denominados nucleótidos LNA y análogos de nucleótidos LNA.

65 Genéricamente, oligonucleótidos LNA, nucleótidos LNA y nucleótidos análogos LNA se describen en el documento WO 99/14226 y las posteriores solicitudes, el documento WO 00/56746, el documento WO 00/56748, el documento WO 00/66604, el documento WO 00/125248, el documento WO 02/28875, el documento WO 2002/094250 y el documento WO 03/006475.

En el contexto de la presente solicitud y reivindicaciones, los inventores diferencian entre “nucleótidos LNA” y “nucleótidos análogos LNA”. Un “nucleótido LNA” es un nucleótido de la fórmula 1:



Fórmula 1 (nucleótido LNA)

Dichos nucleótidos LNA a menudo se denominan “ β -D-oxi-LNA”

En la fórmula 1, B constituye una base nucleotídica. Las bases nucleotídicas comprenden tanto bases nucleotídicas naturales como bases nucleotídicas no naturales. Ejemplos ilustrativos de dichas bases nucleotídicas son y se seleccionan entre adenina, citosina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudocitosina, guanina, timina, uracilo, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinil-6-fluorouracilo, 5-metiltiazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, 7-propin-7-deazaadenina, 7-propin-deazaguanina y 2-cloro-6-aminopurina. Ejemplos preferidos de B son adenina, citosina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudocitosina, guanina, timina, uracilo, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

En la fórmula 1, Z* se selecciona de un enlace internucleosídico y un grupo terminal, y, en la fórmula 1, Z se selecciona desde un enlace a un enlace internucleosídico de un nucleótido/nucleósido precedente y un grupo terminal, con la condición, por supuesto, de que sólo uno de Z y Z* puede ser un grupo terminal.

El enlace internucleosídico como posible significado de Z* significa un enlace internucleosídico con un nucleótido/nucleósido posterior. Ejemplos de enlaces internucleosídicos son O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -O-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, en los que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄. Enlaces internucleosídicos preferidos son -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O, S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S- O-P(O,S)-S- y -S-P(O)₂-S. Una característica concreta de la presente invención es que dos nucleótidos LNA están unidos por un grupo -O-P(O,S)-O- (fosforotioato), es decir, el enlace internucleosídico es, preferentemente, un grupo fosforotioato.

En el presente contexto, con el término “alquilo C₁₋₄” se quiere decir una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificada, en la que la cadena tiene de uno a cuatro átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo.

Cuando el nucleótido LNA es el nucleótido terminal en 5' del compuesto oligomérico, Z* es un grupo terminal; y si el nucleótido LNA es el nucleótido terminal en 3' del compuesto oligomérico, Z es un grupo terminal. Normalmente, dichos grupos terminales se seleccionan de hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O, Act-O, mercapto, Prot-S-, Act-S-, alquiltio-C₁₋₆, amino, Prot-N(R^H), Act-N(R^H), mono o di(alquilC₁₋₆)amino, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinoxilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinoxilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinoxilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinoxilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, monofosfato, monotiofosfato, difosfato, ditiofosfato trifosfato, tritiofosfato, intercalantes del ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxi, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂, Act-O-CH₂, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂, Act-N(R^H)-CH₂, carboximetilo y sulfonometilo, en los que Prot es un grupo de protección para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, Act es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆. Ejemplos preferidos de grupos terminales son hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O, Act-O, mercapto, Prot-S, Act-S, alquiltio-C₁₋₆, amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono o di(alquilC₁₋₆)amino, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, monofosfato, monotiofosfato, difosfato, ditiofosfato trifosfato y tritiofosfato, en los que Prot es un grupo de protección para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, Act es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₆.

Grupos de protección (Prot) de sustituyentes hidroxilo (y azufre) comprenden tritilo sustituido, tal como 4,4'-dimetiloxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT) y tritiloxi, 9-(9-fenil)xanteniloxi (pixilo) opcionalmente sustituido, metoxitetrahidropiranioloxi (mthp) opcionalmente sustituido, sililoxi tal como trimetilsililoxi (TMS), triisopropilsili-

ES 2 344 566 T3

loxi (TIPS), terc-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi y fenildimetilsililoxi, terc-butiléteres, acetales (incluidos dos grupos hidroxilo), aciloxi tal como acetilo o acetilos sustituidos con halógeno, por ejemplo cloroacetiloxi o fluoroacetiloxi, isobutiriloxi, pivaloiloxi, benzoiloxi y benzoílos sustituidos, metoximetiloxi (MOM) y éteres de bencilo o éteres de bencilo sustituidos tales como 2,6-diclorobenciloxi (2,6-Cl₂Bzl). Grupos de protección preferidos de sustituyentes hidroxilo (y azufre) comprenden tritilo sustituido, tales como 4,4'-dimetoxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT), 9-(9-fenil)xanteniloxi (pixilo) opcionalmente sustituido, metoxitetrahidropiraniloxi (mthp) opcionalmente sustituido, sililoxi tal como trimetilsililoxi (TMS), triisopropilsililoxi (TIPS), terc-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi y fenildimetilsililoxi, terc-butiléteres, acetales (incluidos dos grupos hidroxilo) y aciloxi, tal como acetilo.

Ejemplos ilustrativos de grupos protectores de grupos amino y amido son fluorenilmetoxycarbonilamino (Fmoc), terc-butiloxycarbonilamino (BOC), trifluoroacetilamino, aliloxycarbonilamino (aloc, AOC), Z-benciloxycarboxitritilamino (Cbz), benciloxycarbonilaminos sustituidos tales como 2-cloro-benciloxycarbonilamino (2-ClZ), monometoxitritilamino (MMT), dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino y 9-(9-fenil)xantenilamino (pixilo). Ejemplos preferidos son fluorenilmetoxycarbonilamino (Fmoc), terc-butiloxycarbonilamino (BOC), triacetilamino, aliloxycarbonilamino (aloc, AOC), monometoxitritilamino (MMT), dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino.

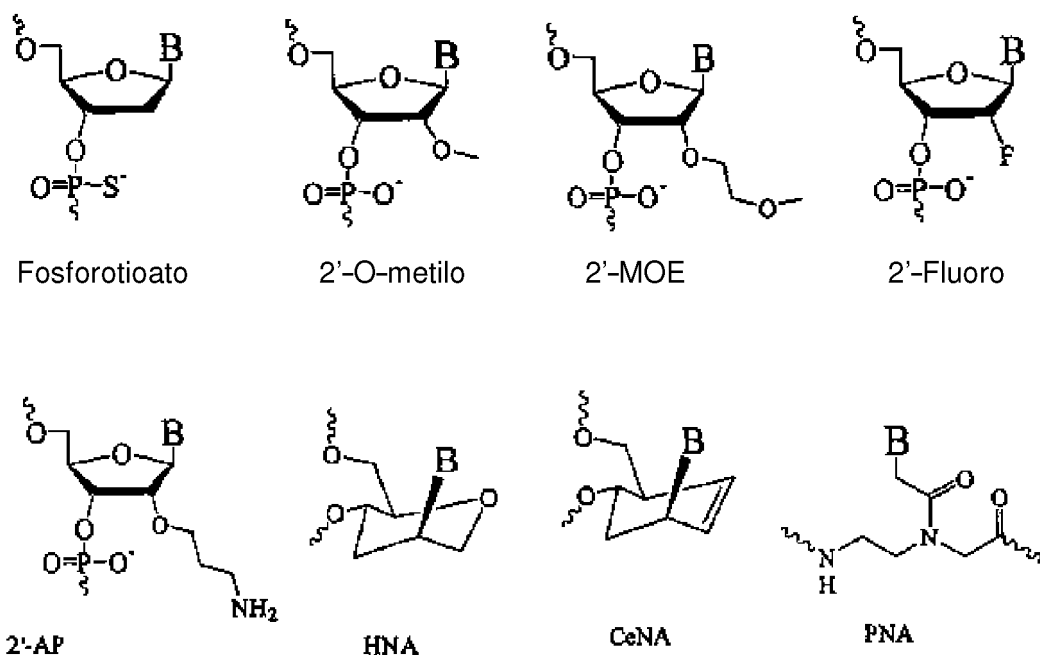
El grupo "Act" designa un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, para acoplar a otros nucleótidos, fases sólidas, proteínas etc. En la forma de realización anterior, Act designa un grupo de activación. Dichos grupos de activación se seleccionan de, por ejemplo O-fosforoamidita opcionalmente sustituida, O-fosfotriéster opcionalmente sustituido, O-fosfodiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido y O-fosfonato opcionalmente sustituido.

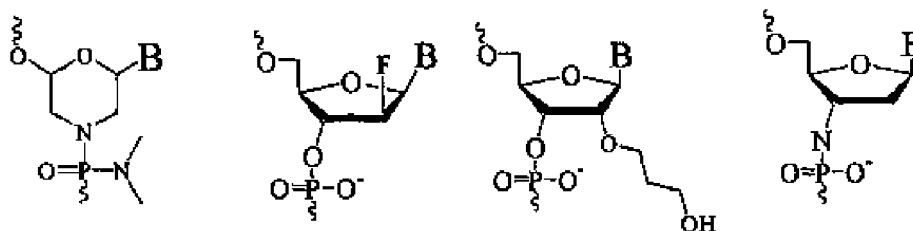
En el presente contexto, el término "fosforamidita" quiere decir un grupo de la fórmula -P(OR^X)-N-(R^Y)₂, en la que R^X designa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo metilo, 2-cianoetilo o bencilo, y cada uno de R^Y designa grupos alquilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo etilo o isopropilo, o el grupo -N-(R^Y)₂ forma un grupo morfolino (-N(CH₂CH₂)₂O). R^X designa, preferentemente, 2-cianoetilo y los dos R^Y son, preferentemente, idénticos y designan isopropilo. Por tanto, una fosforamidita especialmente relevante es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil) fosforamidita.

Como se ha mencionado en lo que antecede, los compuestos oligoméricos comprenden nucleótidos LNA, posiblemente en combinación con nucleótidos que no son nucleótidos LNA. Dichos nucleótidos incluyen desoxirribonucleótidos (nucleótidos de ADN), ribonucleótidos (nucleótidos de RNA), derivados nucleotídicos, nucleótidos análogos LAN, análogos nucleótidos (distintos a LNA) y unidades de PNA, etc.

Análogos nucleotídicos y derivados nucleotídicos se describen en, por ejemplo, Freier & Altmann (Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443) y Uhlmann (Curr. Opinion in Drug & Development (2000, 3(2): 293-213). El esquema 1 ilustra ejemplos seleccionados del presente:

Esquema 1



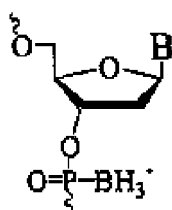


Morfolino

2'-F-ANA

2'-(3-hidroxi)propilo

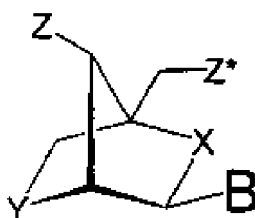
3'-fosforamidato



Boranofosfatos

El término “nucleótido análogo LNA” se refiere a análogos nucleotídicos bicíclicos como los que generalmente se describen en el documento WO 99/14226 y las posteriores solicitudes, el documento WO 00/56746, el documento WO 00/56748, el documento WO 00/66604, el documento WO 00/125248, el documento WO 02/28875, el documento WO 2002/094250 y el documento WO 2003/006475 (PCT/DK02/00488) (cf. lo anterior), excluidos, sin embargo, los “nucleótidos LNA” ya descritos.

Ejemplos de un grupo concreto de nucleótidos análogos LNA preferidos se ponen de ejemplo con la fórmula 2:



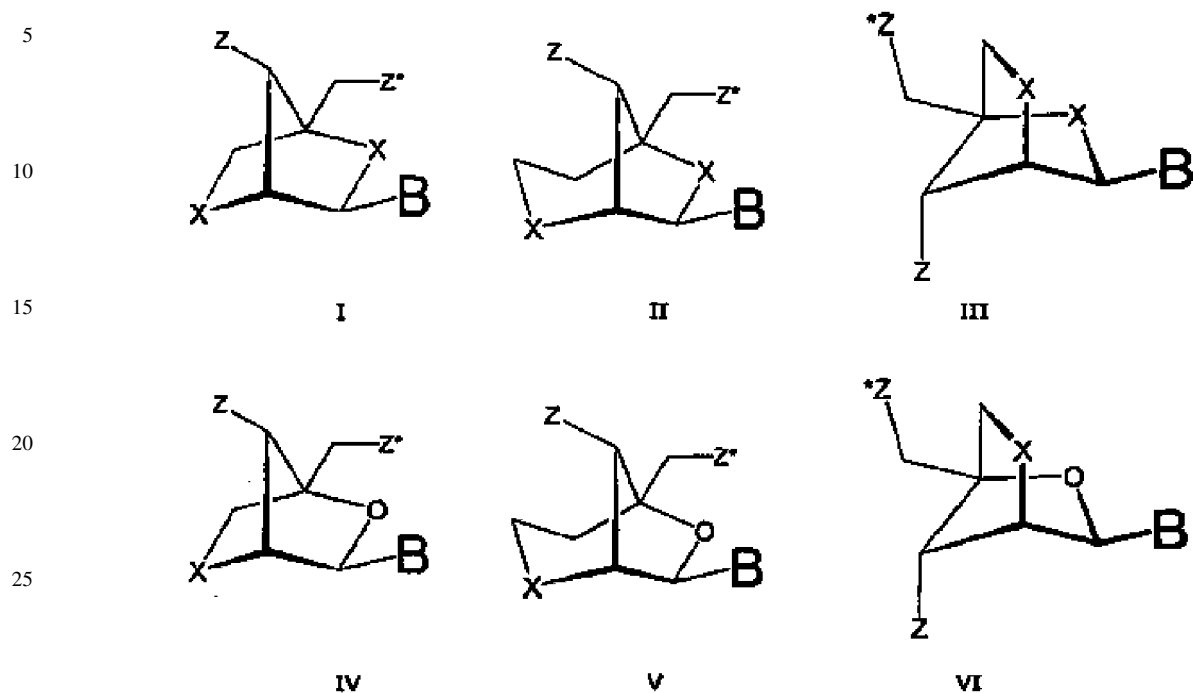
Fórmula 2 (nucleótido análogo LNA)

En la fórmula 2, X e Y se seleccionan de forma independiente de -O-, -S-, -N(H)-, -N(R)-, -CH₂- o -CH-(si es parte de un doble enlace), -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-N(H)-, -CH₂-N(R)-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CH-(si es parte de un doble enlace), -CH=CH-, en la que R se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄. Los grupos asimétricos se pueden encontrar en cualquier orientación. En formas de realización preferidas, X es oxígeno e Y se selecciona de -O-, -S-, -N(H)- y N(R)-, observándose que “nucleótidos LNA” (X= O e Y= O) no están incluidos.

El compuesto oligomérico de la invención puede además llevar grupos Z y Z* como las definidas para los nucleótidos LNA.

En la fórmula 2, los cuatro centros quirales se muestran en una configuración fija. No obstante, también en la presente invención están comprendidos los compuestos de la fórmula general 2 en la que los centros quirales se encuentran en diferentes configuraciones. Por tanto, cada centro quiral en la fórmula 2 puede existir en la configuración R o S. La definición de R (derecha) y S (izquierda) se describen en las Recomendaciones de la IUPAC de 1974, Sección E, Estereoquímica fundamental. Las normas se pueden encontrar en Pure Appl. Chem. 45, 13-30, (1976) y en “Nomenclature of organic Chemistry” Pergamon, New York, 1979.

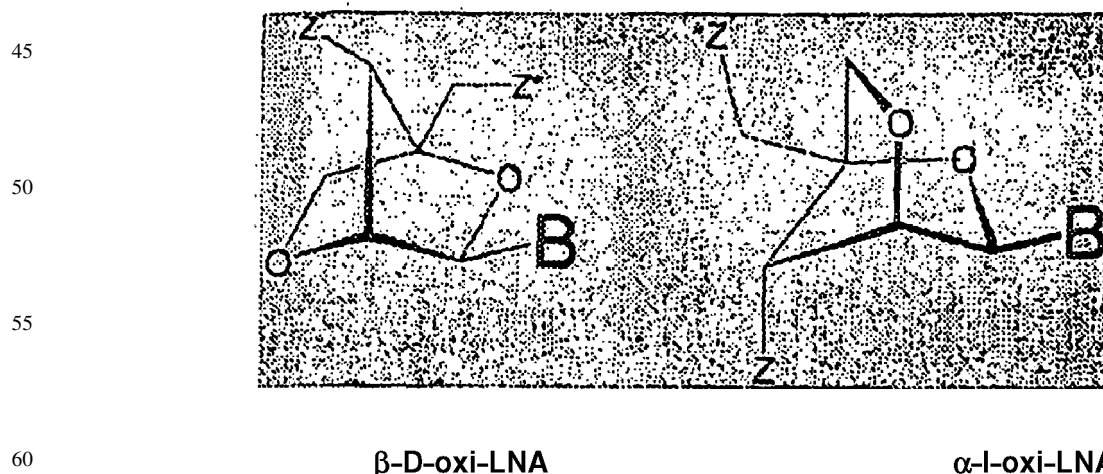
Ejemplos concretos de "nucleótidos análogos LNA" se ilustran mediante las fórmulas I, II, III, IV, V y VI:



Un ejemplo es el nucleótido "tio-LNA", es decir un nucleótido análogo LNA en el que al menos una de las X en las fórmulas I, III, IV o VI se selecciona de -S- o -CH₂-S-. Este tio-LNA puede estar en la configuración beta-D (I y IV) y en la configuración alfa-L (III y VI), respectivamente.

Otro ejemplo es el nucleótido "amino-LNA", es decir un nucleótido análogo LNA en el que al menos una de las X en las fórmulas I, III, IV o VI se selecciona de -N(H)-, -N(R)-, -CH₂-N(H)-, -CH₂-N(R)-, en las que R se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄. Este amino-LNA puede estar en la configuración beta-D (I y IV) y en la configuración alfa-L (III y VI), respectivamente.

Otro ejemplo es el nucleótido "ena-LNA", es decir un nucleótido análogo LNA en el que al menos una de las X en las fórmulas II o V es -CH₂-O-.



En otra forma de realización más, el compuesto oligomérico comprende un nucleótido "alfa-L-LNA" (es decir, " α -L-LNA"), es decir un nucleótido LNA como se muestra en la fórmula III y VI.

Es decir, los análogos nucleotídicos LNA, si están presentes, se seleccionan, preferentemente, de tio-LNA y α -L-oxi-LNA, en particular todos los análogos nucleotídicos LNA, si están presentes, son α -L-oxi-LNA.

ES 2 344 566 T3

Como se ha mencionado en lo que antecede, la presente invención se refiere, en particular, a un compuesto oligomérico que consta de la secuencia C_sT_sC_sC_sC_sA_sC_sG_sT_sG_sC_sG_sC_sC_sA (SEC ID N° 15), en la que las letras en mayúscula designan los nucleótidos LNA, las letras minúsculas designan los nucleótidos de AND, el subíndice “s” designa que los nucleótidos adyacentes están unidos por un grupo fosforotioato y en la que todos los monómeros LNA-C son metil-C.

Por tanto, el compuesto oligomérico tiene una longitud de 16 bases nucleotídicas. El dominio de unión a la diana del mismo tiene una longitud de 16 bases nucleotídicas/nucleótidos.

El dominio de unión a la diana constituye todo el compuesto oligomérico.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “hibridación” significa unión de hidrógeno, que puede ser unión de Watson-Crick, de Hoogsteen, de hidrógeno de Hoogsteen inverso, etc. entre nucleósidos o bases nucleotídicas complementarias. Hace aproximadamente cincuenta años, Watson y Crick demostraron que el ácido desoxirribonucleico (ADN) está compuesto por dos cadenas que se mantienen juntas en una configuración helicoidal mediante puentes de hidrógeno formados entre bases nucleotídicas complementarias opuestas en las dos cadenas. Las cuatro bases nucleotídicas que normalmente se encuentran en el ADN son guanina (G), adenina (A), timina (T) y citosina (C) de las que la base nucleotídica G se aparea con C y la base nucleotídica A se aparea con T. En el ARN, la base nucleotídica timina está sustituida por la base nucleotídica uracilo (U), que de un modo similar a la base nucleotídica T, se aparea con A. Los grupos químicos en las bases nucleotídicas que participan en la formación del dúplex estándar constituyen la cara de Watson-Crick. Hoogsteen demostró un par de años después que las bases nucleotídicas de purina (G y A), además de su cara de Watson-Crick, tienen una cara de Hoogsteen que se puede reconocer desde el exterior de un dúplex y usarse para unir los oligonucleótidos de pirimidina a través de puentes de hidrógeno formando de este modo una estructura de triple hélice.

El término “específicamente hibridizable” significa que el compuesto oligomérico en cuestión es capaz de unirse con la suficiente fuerza y de forma específica al ARNm diana para proporcionar la interferencia deseada con la función normal del ARNm diana mientras que no afecta a la función de los ARNm no diana. Normalmente, la hibridación relevante y, por tanto, la interferencia con la función tiene lugar en condiciones fisiológicas, es decir a aproximadamente 37°C. No obstante, esto no excluye que en el dominio de unión a la diana pueda presentarse una o dos faltas de correspondencia. Preferentemente, el dominio de unión a la diana no incluye faltas de correspondencia o, como máximo, una falta de correspondencia (véase más adelante).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “ARNm diana” significa el ARNm de Bcl-2 humano que codifica la proteína Bcl-2 humana.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “modulación” significa una disminución (p, ej., inhibición) de la expresión del gen Bcl-2 humano a través de la unión de un compuesto oligomérico al ARNm de Bcl-2 humano que codifica la proteína bcl-2.

La “hibridación específica” se obtiene mediante la unión del dominio de unión a la diana a la región especificada del ARNm diana.

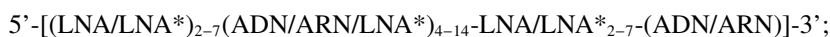
Todos los enlaces nucleotídicos (con más precisión, los enlaces entre nucleósidos, es decir enlaces internucleosídicos) en el dominio de unión a la diana son grupos fosforotioato ((-O-P(O,S)-O-). En el compuesto oligomérico de la invención, todos los enlaces nucleotídicos son grupos fosforotioato. En particular, todos los enlaces nucleotídicos en el compuesto oligomérico son grupos fosforotioato.

En el compuesto oligomérico de la invención, las bases nucleotídicas en el dominio de unión a la diana son bases nucleotídicas de LNA o nucleótidos análogos LNA.

Las dos bases nucleotídicas en el extremo 5' de dicho dominio de unión a la diana son bases nucleotídicas de nucleótidos LNA.

La base nucleotídica en el extremo 3' de dicho dominio de unión a la diana es una base nucleotídica de un nucleótido de ADN.

El compuesto oligomérico tiene un dominio de unión a la diana que tiene un diseño de gapmer, por ejemplo un diseño de gapmer LNA/(no LNA)/LNA. Las variantes concretas de un constructo de gapmer definido en lo que antecede son dominios de unión a la diana que tienen una fórmula seleccionada de:



ES 2 344 566 T3

Se cree que los cuatro tipos de gapmer mencionados en lo que antecede conducirán al mismo tipo de especies activas, a saber, un gapmer del tipo $5'-(\text{LNA/LNA}^*)_{2-7}(\text{AND/ARN/LNA}^*)_{4-14}\text{-LNA/LNA}^*_{2-7}\text{-}3'$, tras la escisión del resto de ADN $_{5'}$ o $3'$ mediante exonucleasas, cf. el Ejemplo 15. Por tanto, dado que la SEC IID N° 15 es un gapmer particularmente preferido (y compuesto diferenciado), se deduce que la SEC ID N° 29 se cree que es igualmente interesante. De forma similar, la SEC ID N° 8 es un gapmer particularmente preferido (y compuesto diferenciado), se deduce que la SEC ID N° 35 se cree que es igualmente interesante.

Un diseño concreto de un constructo de gapmer es aquel en el que el dominio de unión a la diana tiene la fórmula $5'-(\text{LNA/LNA}^*)_{2-7}(\text{AND/ARN/LNA}^*)_{4-14}\text{-LNA/LNA}^*_{2-7}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, tal como $5'-(\text{LNA/LNA}^*)_{2-5}(\text{AND/ARN/LNA}^*)_{7-12}\text{-LNA/LNA}^*_{2-5}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, en particular $5'-(\text{LNA/LNA}^*)_{2-4}(\text{ADN/ARN/LNA}^*)_{10-12}\text{-LNA/LNA}^*_{2-4}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$.

La expresión “(LNA/LNA*)” significa que el segmento en cuestión (es decir, un segmento que comprende 2-7 nucleótidos) puede incluir nucleótidos LNA, nucleótidos análogos LNA, o ambos. Por analogía, el segmento “(AND/ARN/LNA*)” puede incluir desoxirribonucleótidos (nucleótidos de ADN), ribonucleótidos (nucleótidos de ARN) y nucleótidos análogos LNA y combinaciones de los mismos. EL segmento “(ADN/ARN)” puede incluir desoxirribonucleótidos (nucleótidos de ADN) y ribonucleótidos (oligonucleótidos de ARN o ambos).

Se cree que el subsegmento $-(\text{ADN/ARN/LNA}^*)_{4-14}$ debería poder reclutar ARNasaH, razón por la cual este subsegmento consta, preferentemente, de nucleótidos de ADN o nucleótidos análogos LNA en forma de nucleótidos α -L-LNA, en particular de nucleótidos de ADN. Aunque se define como un subsegmento de una longitud de 4 a 14 bases nucleotídicas, se cree que una longitud en el intervalo de 7 a 12 bases nucleotídicas, tales como de 10 a 12 bases nucleotídicas, en particular 11 bases nucleotídicas, conduce a gapmer particularmente útiles, cf. la Tabla 1.

Por tanto, un diseño más concreto es uno en el que el dominio de unión a la diana de un constructo de gapmer tiene la fórmula $5'-(\text{LNA/LNA}^*)_{2-7}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{5-14}\text{-LNA/LNA}^*_{2-7}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, tal como $5'-(\text{LNA/LNA}^*)_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA/LNA}^*_{2-5}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, en particular $5'-(\text{LNA/LNA}^*)_{2-4}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{10-12}\text{-LNA/LNA}^*_{2-4}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$.

Otro diseño particularmente interesante es uno en el que el dominio de unión a la diana de un constructo gapmer tiene la fórmula $5'[\text{LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{4-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN/ARN})]\text{-}3'$, tal como $5'[\text{LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN/ARN})]\text{-}3'$, en particular $5'[\text{LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN/ARN})]\text{-}3'$. Otro diseño más particularmente interesante es uno en el que el dominio de unión a la diana tiene la fórmula $5'[\text{LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ARN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-7}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ARN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-7}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})]\text{-}3'$, tal como $5'[\text{LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ARN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ARN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})]\text{-}3'$, en particular $5'[\text{LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ARN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-4}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ARN})]\text{-}3'$ o $5'[\text{LNA}_{2-4}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})]\text{-}3'$. En un constructo de gapmer, el dominio de unión a la diana puede tener la fórmula $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-}(\text{LNA/LNA}^*)_{2-7}(\text{ADN/ARN/LNA}^*)_{4-14}\text{-LNA/LNA}^*_{2-7}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, en particular la fórmula $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{4-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, por ejemplo $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-}(\text{LNA/LNA}^*)_{2-7}(\text{ADN/ARN})\text{-}(\text{LNA/LNA}^*)_{2-5}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, en particular la fórmula $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, o $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-}(\text{LNA/LNA}^*)_{2-4}(\text{ADN/ARN/LNA}^*)_{10-12}\text{-LNA/LNA}^*_{2-4}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$, en particular la fórmula $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN/ARN})\text{-}3'$.

Otro diseño más particularmente interesante es aquel en el que el dominio de unión a la diana tiene la fórmula $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}(\text{ARN})\text{-}3'$, tal como $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})\text{-}3'$, en particular $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ARN})\text{-}3'$ o $5'-(\text{ARN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})\text{-}3'$.

En un constructo de gapmer, el dominio de unión a la diana puede tener la fórmula $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-}(\text{LNA/LNA}^*)_{2-7}(\text{ADN/ARN/LNA}^*)_{4-14}\text{-LNA/LNA}^*_{2-7}\text{-}3'$, en particular la fórmula $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{4-14}\text{-LNA}_{2-7}\text{-}3'$, tal como $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-}(\text{LNA/LNA}^*)_{2-5}(\text{ADN/ARN/LNA}^*)_{2-5}\text{-}3'$, en particular la fórmula $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}\text{-}3'$, o $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-}(\text{LNA/LNA}^*)_{2-4}(\text{ADN/ARN/LNA}^*)_{10-12}\text{-LNA/LNA}^*_{2-4}\text{-}3'$, en particular la fórmula $5'-(\text{ADN/ARN})\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}(\text{ADN})_{10-12}\text{-LNA}_{2-4}\text{-}3'$. Otro diseño más particularmente interesante es uno en el que el dominio de unión a la diana tiene la fórmula $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}\text{-}3'$ o $5'-(\text{RNA})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}\text{-}3'$ o $5'-(\text{RNA})\text{-LNA}_{2-7}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{5-14}\text{-LNA}_{2-7}\text{-}3'$, tal como $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}\text{-}3'$ o $5'-(\text{ADN})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}\text{-}3'$ o $5'-(\text{RNA})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}\text{-}3'$ o $5'-(\text{RNA})\text{-LNA}_{2-5}(\text{ADN}/\alpha\text{-L-LNA})_{7-12}\text{-LNA}_{2-5}\text{-}3'$.

ES 2 344 566 T3

LNA₂₋₅]-3' o 5'-[(RNA)-LNA₂₋₅-(ADN/ α -L-LNA)₇₋₁₂-LNA₂₋₅]-3', en particular 5'-[(ADN)-LNA₂₋₄-(ADN)₁₀₋₁₂-LNA₂₋₄]-3' o 5'-[(ADN)-LNA₂₋₄-(ADN/ α -L-LNA)₁₀₋₁₂-LNA₂₋₄]-3' o 5'-[(RNA)-LNA₂₋₄-(ADN)₁₀₋₁₂-LNA₂₋₄]-3' o 5'-[(RNA)-LNA₂₋₄-(ADN/ α -L-LNA)₁₀₋₁₂-LNA₂₋₄]-3'.

5 En otra forma de realización más, el dominio de unión a la diana de un constructo gapmer puede tener la fórmula 5'-[(LNA/LNA*)₂₋₇-(ADN/ARN/LNA*)₄₋₁₄-LNA/LNA*₂₋₇]-3', en particular la fórmula 5'-[LNA₂₋₇(ADN)₄₋₁₄-LNA₂₋₇]-3', tal como 5'-[(LNA/LNA*)₂₋₅-(ADN/ARN/LNA*)₇₋₁₂-LNA/LNA*₂₋₅]-3', en particular la fórmula 5'-[LNA₂₋₅-(ADN)₇₋₁₂-LNA₂₋₅]-3', o 5'-[(LNA/LNA*)₂₋₄-(ADN/ARN/LNA*)₁₀₋₁₂-LNA/LNA*₂₋₄]-3', en particular la fórmula 5'-[LNA₂₋₄-(ADN)₁₀₋₁₂-LNA₂₋₄]-3'.

10 Otro diseño más particularmente interesante es aquel en el que el dominio de unión a la diana de un constructo gapmer puede tener la fórmula 5'-[LNA₂₋₇-(ADN)₅₋₁₄-LNA₂₋₇]-3' o 5'-[LNA₂₋₇-(ADN/ α -L-LNA)₅₋₁₄-LNA₂₋₇]-3', tal como 5'-[LNA₂₋₅-(ADN)₇₋₁₂-LNA₂₋₅]-3' o 5'-[LNA₂₋₅-(ADN/ α -L-LNA)₇₋₁₂-LNA₂₋₅]-3', en particular 5'-[LNA₂₋₄-(ADN)₁₀₋₁₂-LNA₂₋₄]-3' o 5'-[LNA₂₋₄-(ADN/ α -L-LNA)₁₀₋₁₂-LNA₂₋₄]-3'.

15 En alguna forma de realización, un constructo de gapmer puede también comprender nucleótidos análogos LNA (denominados en la presente memoria descriptiva "LNA*"). En particular, el 10-100% o el 0-90%, por ejemplo el 10-50% de las bases nucleotídicas en el dominio de unión a la diana son bases nucleotídicas de nucleótidos análogos LNA (LNA*).

20 En una variante de un constructo de gapmer, el dominio de unión a la diana tiene la fórmula 5'-[(LNA*)₂₋₇-(ADN/ARN/LNA*)₄₋₁₄-LNA*₂₋₇-(ADN/ARN)]-3', en particular 5'-[LNA*₂₋₇-(ADN)₄₋₁₄-LNA*₂₋₇-(ADN/ARN)]-3', tal como 5'-[(LNA*)₂₋₅-(ADN/ARN/LNA*)₇₋₁₂-LNA*₂₋₅-(ADN/ARN)]-3', en particular 5'-[LNA*₂₋₄-(ADN)₁₀₋₁₂-LNA*₂₋₄-(ADN/ARN)]-3', o 5'-[(LNA*)₂₋₄-(ADN/ARN/LNA*)₁₀₋₁₂-LNA*₂₋₄-(ADN/ARN)]-3', en particular 5'-[LNA*₂₋₄-(ADN)₁₀₋₁₂-LNA*₂₋₄-(ADN/ARN)]-3'.

25 Como se ha mencionado en lo que antecede, el compuesto oligomérico debería ser específicamente hibridizable con la región especificada del ARNm diana. Más particularmente, el dominio de unión a la diana es complementario con la parte de la región que va desde la base en la posición n° 1459 (5') a la n1 1476 (3') del ARNm de Bcl-2 humano con el que hibrida específicamente, con la excepción de 1 base nucleotídica no complementaria.

30 En el contexto de la presente invención, el término "complementariedad" se refiere a la capacidad del apareamiento preciso entre nucleótidos de la región relevante del ARNm diana y los nucleótidos de los dominios de unión a la diana. Por ejemplo, si un nucleótido en una posición determinada del ARNm diana es capaz de unirse a través de hidrógeno con un nucleótido del dominio de unión a la diana, el ARNm diana y el dominio de unión a la diana se consideran complementarios entre sí en dicha posición. (De nuevo, a partir de lo anterior debe entenderse que el dominio de unión a la diana es uno que corresponde a la región especificada del ARNm de Bcl-2 humano o un corto fragmento del mismo). Por supuesto, el término "bases nucleotídicas no complementarias" se refiere a la situación en la que la base nucleotídica de un nucleótido concreto no es "complementaria".

35 El dominio de unión a la diana es complementario con la parte de la región que va desde la base en la posición n° 1459 (5') a la n1 1476 (3') del ARNm de Bcl-2 humano con el que hibrida específicamente, con la excepción de 1 base nucleotídica no complementaria. Por tanto, sólo se introduce una falta de coincidencia. Dicha falta de coincidencia existe en el ADN/segmento del compuesto oligomérico de la invención, por ejemplo 3'.

40 En el compuesto oligomérico de la invención, el dominio de unión a la diana comprende una subsecuencia CC-CAXCGT, en la que X es A (adenina).

45 El dominio de unión a la diana es la SEC ID N° 15.

50 El compuesto de la invención es la SEC ID N° 15.

Habiendo dicho esto, actualmente se cree que el compuesto oligomérico SEC ID N° 8 (y también el 35) y el compuesto oligomérico SEC ID N° 15 (Y TAMBIÉN EL 29), cada uno, proporcionan ventajas significativas sobre el compuesto de oblimersen sódico (SEC ID N° 56; referencia) con respecto a los efectos biológicos deseables, cf. los ejemplos.

55 Los presentes inventores han mostrado una mejor reducción *in vivo* del peso tumoral en un modelo de xenoinjerto en ratones de melanoma 518A2 scid cuando se administran 7 mg/kg de la SEC ID N° 8 por vía i.p. durante 14 días y en comparación con la misma dosis de la SEC ID N° 56 (referencia) de la figura 11 y la SEC ID N° 8 muestra una actividad antitumoral igual cuando se administra una dosis 7 veces menor que la SEC ID N° 56 (referencia).

60 En la figura 13 se muestran los niveles de la SEC ID N° 15 en hígado y riñón de ratones NMRI tras una única dosis administrada i.v. (25 mg/kg). Se ha encontrado que la semivida (T_{1/2}) del compuesto activo de SEC ID N° 15 es de aproximadamente 3 días tanto en hígado como en riñón. Esto implica que los regímenes de dosificación de dosis biológicas óptimas de la SEC ID N° 15 podrían ser menos frecuentes que la infusión continua y la dosificación diaria.

ES 2 344 566 T3

Los presentes inventores también han demostrado una eficaz reducción *in vivo* del volumen tumoral usando la SEC ID N° 15 administrada a diario los días 7-15 o los días 8, 11, 13, 15, 18, 20 en comparación con el control salino en un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos atómicos PC3 de próstata, cf. la figura 7D. Los compuestos se administraron por vía i.p. a 10 mg/kg durante 14 días. El crecimiento tumoral se monitorizó durante 8 días adicionales después del tratamiento.

Habiendo dicho esto, los compuestos oligoméricos de la invención tienen un perfil adecuado *in vivo* con respecto a la distribución y la regulación por disminución de Bcl-2 y, por tanto, relevancia terapéutica en relación con diversas afecciones relacionadas con la Bcl-2, en particular cáncer.

Preparación de compuestos oligoméricos

El compuesto oligomérico de la invención se puede preparar tal como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2 en el documento WO 99/14226, el documento WO 00/56746, el documento WO 00/56748, el documento WO 00/66604, el documento WO 00/125248, el documento WO 02/28875, el documento WO 2002/094250, el documento PCT/OK02/00488 y Herdewijn, P., *Oligonucleotide Synthesis, Methods and Applications*, pp 127-145, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005. Por tanto, los compuestos oligoméricos de la invención se pueden producir usando las técnicas de polimerización de química de ácidos nucleicos bien conocidas para un experto en la técnica de la química orgánica. Generalmente se usan ciclos de oligomerización estándar den enfoque con fosforamidita (S. L. Beaucage and R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage and R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223), pero, por ejemplo, también se puede usar química de H-fosfonato, química de fosfotriéster.

Para algunos monómeros de la invención se usaron tiempos de acoplamiento más prolongados y/o acoplamientos repetidos con reactivos frescos y/o uso de reactivos de acoplamiento más concentrados.

Las fosforoamiditas empleadas se acoplaron con rendimientos de acoplamiento escalonados satisfactorios > 95%. La tiolación del fosfato se realiza mediante intercambio de la oxidación normal, por ejemplo yodo/piridina/H₂O, usada para la síntesis de oligómeros de fosforodíéster con una oxidación usando el reactivo ADTT (hidruro de xantano (0,01M en acetonitrilo:piridina 9:1; v/v)), también están comprendidos otros reactivos de violación, tales como de Beaucage. Los oligómeros LNA de fosforotioato se sintetizaron con eficiencia con rendimientos de acoplamiento escalonado >= 98%.

Los oligonucleótidos β -D-amino-LNA, β -D-tio-LNA, los oligonucleótidos α -L-LNA y β -D-metilamino-LNA también se sintetizaron con eficiencia con rendimientos de acoplamiento escalonados \geq 98% usando los procedimientos con fosforoamidita.

La purificación de compuestos oligoméricos de LNA se realizó usando cartuchos de purificación de fase inversa desechables y/o HPLC de fase inversa y/o precipitación en etanol o butanol. Se usaron electroforesis en gel capilar, HPLC de fase inversa, MALDI-MS y ESI-MS para verificar la pureza de los oligonucleótidos sintetizados. Además, los materiales de soporte sólido que tienen en ellos inmovilizada una base nucleotídica opcionalmente protegida y LNA opcionalmente protegido en 5'-OH son especialmente interesantes como material para la síntesis de compuestos oligoméricos que contienen LNA en los que se incluye un nucleótido LNA en el extremo 3'. En este caso, el material de soporte sólido es, preferentemente, CPG, por ejemplo un material de CPG fácilmente disponible (comercialmente) o poliestireno sobre el que se une una base nucleotídica funcionalizada en 3' opcionalmente protegida y LNA opcionalmente protegido en 5'-OH usando las condiciones indicadas por el suministrador de este material concreto.

Sales

El compuesto oligomérico de la invención se puede emplear en una variedad de sales farmacéuticamente aceptables. Como se usa en la presente memoria, el término se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los compuestos identificados en la presente memoria descriptiva sujeto y que exhiben efectos toxicológicos indeseados mínimos. Ejemplos no limitantes de estas sales se pueden formar con aminoácido orgánico y sales de adición de base formadas con cationes metálicos tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares, o con un catión formado de amoníaco, N,N-dimenciletlen-diamina, D-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b); por ejemplo una sal de tannato de cinco o similares.

Dichas sales se forman, por ejemplo, con los compuestos de acuerdo con la invención que poseen un grupo ácido, por ejemplo un grupo carboxilo, un grupo fosfodíéster o un grupo fosforotioato, y son, por ejemplo, sales con bases adecuadas. Estas sales incluyen, por ejemplo, sales de metales no tóxicos que derivan de metales de los grupos Ia, Ib, IIa y IIb del sistema periódico de los elementos, en particular sales de metales alcalinos adecuados, por ejemplo sales de litio, sodio o potasio, o sales de metales alcalino-térreos, por ejemplo sales de magnesio o de calcio. Además incluyen sales de cinc y de amonio, y también sales que se forman con aminas orgánicas, tales como mono, di o trialquilaminas insustituidas o sustituidas con hidroxilo, en particular mono, di o trialquilaminas, o con compuestos de amonio cuaternario, por ejemplo con N-metil-N-etilamina, dietilamina, trietilamina, mono, bis o tris-(2-hidroxi-

alquilo inferior)aminas, tales como mono, bis o tris-(2-hidroxi-etil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina o tris(hidroxi-etil)metilamina, N,N-dialquilo inferior-N-(hidroxi-alquilo inferior)aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxi-etil)amina o tri-(2-hidroxi-etil)amina, o N-metil-D-glucamina, o compuestos de amonio cuaternario, tales como sales de tetrabutilamonio. Se prefieren las sales de litio, sales de sodio, sales de magnesio, sales de cinc o sales de potasio, siendo particularmente preferidas las sales de sodio.

Los compuestos de acuerdo con la invención que poseen un grupo básico, por ejemplo un grupo amino o un grupo imino, pueden formar sales de adición de ácido, por ejemplo con ácidos inorgánicos, por ejemplo con un ácido hidrohálico, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o con ácidos carboxílicos orgánicos, ácidos sulfónicos, sulfoácidos o fosfoácidos, o ácido sulfámico N-sustituido, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotónico o ácido isonicotónico, y, además, con aminoácidos, por ejemplo con aminoácidos alfa, y también con ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroximetanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenodisulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, 2 o 3-fosfoglicerato, ácido glucosa fosfato o N-ciclo-hexisulfámico (con formación de los ciclamatos) o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido ascórbico.

Los compuestos de acuerdo con la invención que poseen grupos ácidos y básicos también pueden formar sales internas. Sales farmacéuticamente inadecuadas, por ejemplo picratos o percloratos, se pueden usar para aislamiento y purificación.

Son únicamente las sales farmacéuticamente toleradas, que no son tóxicas cuando se usan correctamente, que se emplean para fines terapéuticos y que, por tanto, se prefieren.

Conjugados

Otro aspecto de la invención se refiere a un conjugado que comprende el compuesto tal como se define en la presente memoria descriptiva al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico unido covalentemente a dicho compuesto.

En el presente contexto, con el término “conjugado” se pretende indicar una molécula heterogénea formada por la unión covalente de un compuesto oligomérico como se describe en la presente memoria descriptiva (es decir, un compuesto que comprende una secuencia de nucleósidos o análogos nucleosídicos) a uno o más restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos.

Por tanto, los compuestos oligoméricos pueden, por ejemplo, conjugarse o formar una quimera con restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos que incluyen ácidos péptidonucleicos (PNA), proteínas (p. ej., anticuerpos para una proteína diana), macromoléculas, sustancias farmacológicas de bajo peso molecular, cadenas de ácidos grasos, residuos de azúcar, glicoproteínas, polímeros (p. ej., polietilenglicol), grupos formadores de micelas, anticuerpos, hidratos de carbono, grupos de unión a receptores, esteroides tales como colesterol, polipéptidos, agentes intercalantes tales como un derivado de acridina, un alcohol de cadena larga, un dendrímero, un fosfolípido y otros grupos lipófilos o combinaciones de los mismos, etc., como los compuestos oligoméricos pueden disponerse en estructuras dimericas o dendríticas. Los compuestos o conjugados de la invención también pueden estar conjugados o conjugarse además a sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un agente antibacteriano, un compuesto quimioterapéutico o un antibiótico.

La conjugación de este modo confiere propiedades ventajosas con respecto a las características farmacocinéticas de los compuestos oligoméricos de acuerdo con la invención. En particular, la conjugación de este modo alcanza una mayor captación celular.

En una forma de realización, el compuesto oligomérico de la invención está unido a ligandos de modo que forman un conjugado, dichos ligandos están destinados a incrementar la captación celular del conjugado respecto a los oligonucleótidos antisentido. Esta conjugación puede tener lugar en las posiciones terminales 5'/3'-OH, pero los ligandos también pueden tener lugar en los azúcares y/o las bases. Ejemplos de conjugados/ligandos son restos de colesterol Soutschek y col., Nature, 432, 173-178 (2004), intercalantes dúplex tales como acridina, poli-L-lisina, protegiendo los extremos con uno o más grupos de enlace resistentes a nucleasas, tales como fosfomonotioato, complejos de transferrina (Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)), derivados de folato (Low y col., patente de EE.UU. 5.108.921. Véase también Leamon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 5572 (1991) y similares.

Profármacos

En algunas formas de realización de la invención, el compuesto oligomérico puede estar en forma de un profármaco. Los oligonucleótidos son en virtud iones cargados negativamente. Debido a la naturaleza lipofílica de las membranas celulares, la captación celular de oligonucleótidos se reduce en comparación con los equivalentes neu-

5 tros o lipófilos. Esta “hidrancia” de polaridad se puede evitar usando el enfoque del profármaco (véase, por ejemplo, Crooke, R. M. (1998) in Crooke, S. T., Antisense Research and Application Springer-Verlag, Berlin, Alemania, vol. 131, pág. 103-140). En este enfoque, los compuestos oligoméricos se preparan de un modo protegido de modo que los compuestos oligoméricos son neutros cuando se administran. Estos grupos de protección están diseñados de tal modo que se pueden retirar cuando el compuesto oligomérico es captado por las células. Ejemplos de dichos grupos de protección son S-acetiltioetilo (SATE) o S-pivaloiltioetilo (t-butil-SATE). Estos grupos de protección son resistentes a nucleasas y se retiran de forma selectiva intracelularmente.

10 *Principio terapéutico*

Un experto en la técnica apreciará el hecho de que el compuesto oligomérico LNA de la invención se puede usar para combatir enfermedades relacionadas con la Bcl-2 mediante muchos principios diferentes, que, por tanto, entra dentro del espíritu de la presente invención.

15 Por ejemplo, el compuesto oligomérico LNA está diseñado como un inhibidor antisentido que son ácidos nucleicos monocatenarios que previenen la producción de una proteína causante de enfermedad, mediante intervención a nivel de ARNm.

20 En referencia a los principios anteriores por los cuales un compuesto oligomérico LNA puede provocar su acción terapéutica, la diana de la presente invención es el ARNm de Bcl-2.

25 El compuesto oligomérico LNA hibrida con una porción del ARNm de Bcl-2 humano que comprende el sitio de iniciación de la traducción, es decir la región que va desde la base en posición nº 1459 (5') a la base en posición número 1476 (3') del ARNm de Bcl-2 humano que codifica la proteína Bcl-2 humana.

30 El compuesto oligomérico de la invención está diseñado para que sea suficientemente complementario con la diana para proporcionar la respuesta clínica deseada, por ejemplo el compuesto oligomérico debe unirse a su diana con fuerza y especificidad suficientes para dar el efecto deseado. En una forma de realización, dicho compuesto oligomérico LNA está diseñado para modular también otros ácidos nucleicos específicos que no codifican la proteína Bcl-2 humana.

Se prefiere que el compuesto oligomérico de acuerdo con la invención está diseñado para evitar la hibridación oligonucleotídica intra e intermolecular.

35 *Fármacos antisentido*

40 En una forma de realización de la invención, los compuestos oligoméricos LNA se presentan como fármacos antisentido adecuados. El diseño de un potente y seguro fármaco antisentido requiere un ajuste fino de diversos parámetros tales como potencia/eficacia, afinidad/especificidad, estabilidad en los fluidos biológicos, captación celular, modo de acción, propiedades farmacocinéticas y toxicidad.

45 *Afinidad y especificidad:* LNA con un enlace oximetileno 2'-O, 4'C (β -D-oxi-LNA) exhibe propiedades de unión sin precedentes hacia las secuencias diana de ARN y ADN. Asimismo, los derivados de LNA, tales como amino-, tio- y α -L-oxi-LNA muestran afinidades sin precedentes por el ARN y el ADN complementarios, y, en el caso del tio-LNA, la afinidad por el ARN es incluso mayor que con el β -D-oxi-LNA.

50 Además de estas notables propiedades de hibridación, los nucleótidos LNA se pueden mezclar y actuar junto con nucleótidos de ADN y ARN y con otros análogos de ácido nucleico, tales como monómeros de ARN modificados con 2'-O-alkilo. Como tales, los oligonucleótidos de la presente invención pueden estar compuestos por β -D-oxi-LNA en cualquier combinación con ADN, nucleótidos A. La afinidad de unión sin precedentes de LNA por las secuencias diana de ADN o ARN y su capacidad para mezclarse libremente con ADN, ARN y un intervalo de análogos de ácido nucleico contemporáneos tiene una serie de consecuencias importantes de acuerdo con la invención para el desarrollo de compuestos antisentido eficaces y seguros. Además, los oligonucleótidos que contienen LNA presentan una excelente solubilidad acuosa.

60 En primer lugar, en una forma de realización de la invención, se permite un considerable acortamiento de la longitud normal de un oligonucleótido antisentido (de 20-25 mers a uno de 16 mer) sin comprometer la afinidad requerida para la actividad farmacológica. Como la *especificidad intrínseca* de un oligonucleótido se correlaciona inversamente con su longitud, este acortamiento incrementará de forma significativa la especificidad del compuesto antisentido por su ARN diana. Una forma de realización de la invención es, debido a que la secuencia del genoma humano está disponible y la anotación de sus genes está progresando rápidamente, identificar las secuencias únicas más cortas posibles en el ARNm diana.

65 En otra forma de realización, el uso de LNA para reducir el tamaño de los oligonucleótidos antisentido acorta significativamente el proceso y el coste de la fabricación, por lo que proporciona la base de la terapia antisentido para convertirse en una oferta de tratamiento comercialmente competitivo para diversas enfermedades.

ES 2 344 566 T3

En otra forma de realización, la afinidad sin precedentes del LNA se puede usar para potenciar sustancialmente la capacidad del compuesto oligomérico para hibridar con su ARNm diana *in vivo*, de modo que se reduce significativamente el tiempo y el esfuerzo requeridos para identificar un compuesto activo en comparación con la situación con otras químicas.

5

En otra forma de realización, la afinidad sin precedentes de LNA se usa para potenciar la potencia de los oligonucleótidos antisentido, lo que permite el desarrollo de compuestos con ventanas terapéuticas más favorables que los que actualmente están en ensayos clínicos.

10

Cuando se diseña como un inhibidor antisentido, los oligonucleótidos de la invención se unen específica y selectivamente al ácido nucleico diana y modulan la expresión de su proteína conocida. Preferentemente, dicha modulación produce una inhibición de la expresión de al menos 10% o 20% en comparación con el nivel de expresión normal, más preferentemente una inhibición de al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% en comparación con el nivel de expresión normal.

15

Estabilidad en fluidos biológicos: Una forma de realización de la invención incluye la incorporación de nucleótidos LNA en un oligonucleótido estándar de ADN o ARN para incrementar la estabilidad del compuesto oligomérico resultante en fluidos biológicos, por ejemplo a través del incremento de la resistencia a las nucleasas (endonucleasas y exonucleasas). La extensión de la estabilidad dependerá del número de nucleótidos LNA usado, su posición en el oligonucleótido y el tipo de nucleótidos LNA usados. En comparación con el ADN y los fosforotioatos, se puede establecer el siguiente orden de capacidad para estabilizar un oligonucleótido contra la degradación nucleotídica: ADN << fosforotioatos ~oxi-LNA < α -L-LNA < amino-LNA < tio-LNA.

20

Dado el hecho de que el LNA es compatible con la síntesis estándar de ADN y SE mezcla libremente con muchos análogos de ácido nucleico con resistencia a nucleasa de compuestos oligoméricos-LNA se pueden potenciar adicionalmente de acuerdo con la invención mediante la incorporación de otros análogos que muestran un incremento de la estabilidad a las nucleasas o mediante la explotación de los enlaces internucleosídicos resistentes a nucleasas, por ejemplo enlaces fosforomonotioato, fosforoditioato y metilfosfonato, etc.

25

Modo de acción: Los compuestos antisentido de acuerdo con la invención pueden provocar su acción terapéutica a través de diversos mecanismos y pueden ser capaces de combinar varios de estos en el mismo compuesto. En un escenario, la unión del oligonucleótido a su diana (pre-ARNm o ARNm) actúa para prevenir la unión de otros factores (proteínas, otros ácidos nucleicos, etc.) necesaria para el funcionamiento adecuado de la diana, es decir funciona mediante hidrancia estérica. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido se puede unir a los motivos de secuencia en el pre-ARNm o el ARNm que son importantes para el reconocimiento y la unión de factores de transacción implicados en el corte y empalme, la poliadenilación, el transporte celular, las modificaciones postranscripcionales de los nucleósidos en el ARN, el recubrimiento del extremo 5', la traducción etc. en el caso del corte y empalme del pre-ARNm, el resultado de la interacción entre el oligonucleótido y su diana puede ser mediante supresión de la expresión de una proteína no deseada, la generación de ARNm sometido a corte y empalme alternativo que codifica una proteína deseada o ambos.

30

35

40

En otra forma de realización, la unión del oligonucleótido a su diana desactiva el proceso de traducción mediante la creación de un bloque físico para la maquinaria ribosómica, es decir detiene la traducción.

45

En otra forma de realización más, la unión del oligonucleótido a su diana interfiere con la capacidad del ARN para adoptar estructuras secundarias y de orden superior que son importantes para su funcionamiento adecuado, es decir interferencia estructural. Por ejemplo, el oligonucleótido puede interferir con la formación de estructuras de tallo-bucle que desempeñan papeles cruciales en diferentes funciones, tales como proporcionando estabilidad adicional al ARN o adoptando motivos de reconocimiento esencial para diferentes proteínas.

50

En otra forma de realización más, la unión del oligonucleótido inactiva la diana hacia otros procesos metabólicos celulares mediante reclutamiento de enzimas celulares que degradan el ARNm. Por ejemplo, el oligonucleótido puede comprender un segmento de nucleósidos que tienen la capacidad para reclutar ribonucleasa H (ARNasa H) que degrada la parte de ARN de un dúplex de ADN/ARN. Asimismo, el oligonucleótido puede comprender un segmento que reclute ARNasas de doble cadena, tales como, por ejemplo, ARNasaIII o puede comprender una secuencia guía externa (EGS) que recluta una enzima endógena (ARNasa P) que degrada el ARNm diana. Asimismo, el oligonucleótido puede comprender un motivo de secuencia que exhibe actividad catalítica de ARNasa o los restos pueden estar unidos a los oligonucleótidos que cuando se acercan a la diana mediante el acontecimiento de hibridación inutilizan en la diana actividades metabólicas adicionales.

55

60

Según lo mencionado, se define que el tamaño del hueco de los gapmer, es decir el subsegmento, tiene una longitud de 4 a 14 bases nucleotídicas, pero se cree que una longitud en el intervalo de 8 a 13 bases nucleotídicas, tales como de 10 a 12 bases nucleotídicas, en particular 11 bases nucleotídicas, conduce a gapmer particularmente útiles, cf. Tabla 1.

65

Propiedades farmacocinéticas

La eficacia clínica de los oligonucleótidos antisentido depende de su farmacocinética, por ejemplo absorción, distribución, captación celular, metabolismo y excreción. A su vez, estos parámetros se guían significativamente por la química subyacente y el tamaño y la estructura tridimensional del oligonucleótido.

Como se ha mencionado en lo que antecede, el LNA de acuerdo con la invención no es una única química sino varias químicas relacionadas, que, aunque son molecularmente diferentes, todas exhiben una sorprendente afinidad por el ADN y el ARN complementario. Por tanto, la familia de químicas de LNA está adaptada de forma única del desarrollo de oligos de acuerdo con la invención con propiedades farmacocinéticas adaptadas explotando bien la elevada afinidad del LNA para modular el tamaño de los compuestos activos o explotando diferentes químicas de LNA para modular la composición molecular exacta de los compuestos activos. En el último caso, el uso de, por ejemplo, amino-LNA en lugar de oxi-LNA cambiará la carga global del compuesto oligomérico y afectará al comportamiento de captación y distribución. Asimismo, el uso de tio-LNA en lugar de de oxi-LNA aumentará la lipofilidad del oligonucleótido y, por tanto, influirá sobre su capacidad para pasar a través de barreras lipofílicas tales como, por ejemplo, la membrana celular.

La modulación de las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido LNA de acuerdo con la invención puede conseguirse adicionalmente a través de la unión de diversos restos diferentes. Por ejemplo, la capacidad de los oligonucleótidos para atravesar la membrana celular puede potenciarse mediante la unión de, por ejemplo, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, un tioéter, una cadena alifática, un fosfolípido o una poliamina, al oligonucleótido. Asimismo, la captación de oligonucleótidos LNA en las células puede potenciarse mediante la conjugación de restos con el oligonucleótido que interacciona con las moléculas en la membrana, que media el transporte hacia el citoplasma.

25 *Propiedades farmacodinámicas*

De acuerdo con la invención, las propiedades farmacodinámicas pueden potenciarse con grupos que mejoran la captación de oligómeros, potencian la bioestabilidad, tal como potencian la resistencia del oligómero a la degradación, y/o incrementan la especificidad y la afinidad de las características de hibridación de oligonucleótidos con la secuencia diana, por ejemplo una secuencia de ARNm.

35 *Toxicología*

Básicamente, hay dos tipos de toxicidad asociados con los oligómeros antisentido: toxicidad dependiente de la secuencia, que implica al dominio de unión a la diana, e independiente de la secuencia, toxicidad relacionada con la clase. Con la excepción de los problemas relacionados con la inmuoestimulación por motivos de secuencia CpG nativa, las toxicidades que han sido las más importantes en el desarrollo de oligonucleótidos antisentido son independientes de la secuencia, por ejemplo relacionados con la química del oligonucleótido y la dosis, el modo, la frecuencia y la duración de la administración. La clase de fosforotioatos de oligonucleótidos se han caracterizado particularmente bien y se ha encontrado que provocan una serie de efectos adversos, tales como la activación del complemento, un PTT (tiempo de tromboplastina parcial) prolongado, trombocitopenia, hepatotoxicidad (elevación de las enzimas hepáticas), esplenomegalia e hiperplasia de células reticuloendoteliales.

Como se ha mencionado en lo que antecede, la familia de químicas de LNA proporciona una afinidad sin precedentes, una bioestabilidad muy elevada y la capacidad para modular la exacta composición molecular del oligonucleótido. En una forma de realización de la invención, los compuestos que contienen LNA permiten el desarrollo de oligonucleótidos que combinan una potencia elevada con pocos, si algunos, enlaces fosforotioato y que, por tanto, es probable que muestren mejores eficacia y seguridad que los compuestos antisentido actuales.

55 *Composición farmacéutica*

Según lo que antecede, debe entenderse que la invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un compuesto oligomérico o un conjugado como se ha definido en la presente memoria descriptiva, y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Las instrucciones para la preparación de composiciones farmacéuticas se pueden encontrar en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" de Alfonso R. Gennaro, y en los siguientes.

Los transportadores farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de unión y adyuvantes, son parte de la composición farmacéutica. Cápsulas, comprimidos y píldoras etc. pueden contener, por ejemplo, los compuestos siguientes: celulosa microcristalina, goma o gelatina como ligantes, almidón o lactosa como excipientes; estearatos como lubricantes; varios endulzantes o agentes aromatizantes. Para las cápsulas, la unidad de dosificación puede contener un transportador líquido, como aceites grasos. Asimismo, recubrimientos de azúcar o agentes entéricos pueden ser parte de la unidad de dosificación. La composición farmacéutica puede también ser emulsiones de los ingredientes farmacéuticos activos (incluido el compuesto oligomérico) y un lípido que forma una emulsión micelar.

ES 2 344 566 T3

Un compuesto oligomérico de la invención se puede mezclar con cualquier material que no altere la acción deseada o con material que suplementa la acción deseada. Estos podrían incluir otros fármacos, incluidos otros compuestos nucleosídicos.

5 Para administración intravenosa, subcutánea o tópica, la formulación puede incluir un diluyente estéril, tampones, reguladores de la tonicidad y antibacterianos. El compuesto activo puede prepararse con transportadores que protegen contra la degradación o la eliminación inmediata del cuerpo, incluidos implantes o microcápsulas con propiedades de liberación controlada. Para administración intravenosa, los transportadores preferidos son solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato.

10 Preferentemente, un compuesto oligomérico está incluido en una formulación unitaria, tal como en un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz sin causar graves efectos secundarios en el paciente tratado.

15 En formas de realización preferidas de las composiciones farmacéuticas, el compuesto oligomérico se formula en un transportador acuoso, en particular un transportador acuoso que comprende un tampón para mantener el pH en el intervalo de 4,0-8,5 y que tiene una fuerza iónica de 20-2000 mM.

20 El término "transportador acuoso" significa que la composición farmacéutica en cuestión está en forma líquida y que el transportador líquido está compuesto predominantemente por agua, es decir que al menos un 80% (p/p) o al menos un 90% (p/p) o incluso al menos un 95% (p/p) del transportador consiste en agua. También se pueden usar otros ingredientes líquidos, por ejemplo etanol, DMSO, etilenglicol etc.

25 Preferentemente, el transportador acuoso comprende un tampón para mantener el pH en el intervalo de 4,0-8,5. Preferentemente, el tampón mantendrá el pH en el intervalo de 5,0-8,0, tal como en el intervalo de 6,0-7,5.

La fuerza iónica/tonicidad de la composición farmacéutica también es de importancia. Por tanto, normalmente, la composición farmacéutica líquida tiene una fuerza iónica en el intervalo de 20-2000 mM, tal como en el intervalo de 50-1500 mM, o en el intervalo de 100-1000 mM.

30 En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende un compuesto oligomérico como se ha definido en la presente memoria descriptiva en un transportador acuoso; y dicho transportador acuoso comprende un tampón para mantener el pH en el intervalo de 4,0-8,5 y tiene una fuerza iónica de 20-2000 mM.

35 En otra forma de realización, la composición farmacéutica líquida que comprende un conjugado en un transportador acuoso, dicho conjugado consta de un compuesto oligomérico como se ha definido en la presente memoria descriptiva y al menos un resto no nucleotídico/no polinucleotídico unido covalentemente a dicho compuesto oligomérico; y dicho transportador acuoso comprende un tampón para mantener el pH en el intervalo de 4,0-8,5 y tiene una fuerza iónica de 20-2000 mM.

40 El dominio de unión a la diana del compuesto oligomérico es la SEC ID N° 15, el compuesto es la SEC ID N° 15 (y 29).

45 En otra forma de realización, la composición farmacéutica también comprende otro agente seleccionado de los grupos constituidos por compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivirales, compuestos citostáticos, compuestos antiangiogénicos, compuestos antiproliferativos, compuestos proapoptóticos, moduladores de la transducción de la señal e inhibidores de la quinasas.

50 En una variante particularmente interesante, el otro agente es al menos un compuesto quimioterapéutico. Ejemplos adecuados de dicho compuesto quimioterapéutico son los seleccionados del grupo constituido por adrenocorticosteroides, tales como prednisona, dexametasona o decadrón; altermamina (hexaleno, hexametilmelamina (HMM)); amifostina (etiol); aminoglucetimidina (cytadren); amsacrina (M-AMSA); anastrozol (arimidex); andrógenos, tales como testosterona; asparaginasa (elspar); bacilo de Calmette-Guérin; bicalutamida (casodex); bleomicina (blenoxano); busulfán (myleran); carboplatino (paraplatino); carmustina (BCNU, BiCNU); clorambucilo (leukeran); clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina); cisplatino (platinol); citosina arabinósido (citarabina); dacarbazina (DTIC); dactinomicina (actinomicina-D, cosmegen); daunorubicina (cerubidina); docetaxel (taxotere); doxorubicina (adriomicina); epirubicina; estramustina (emcyt); estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES); etópsido (VP-16, VePesid, etoposfos); fludarabina (fludara); flutamida (eulexina); 5-FUDR (floxuridina); 5-fluorouracilo (5-FU); gemcitabina (gemzar); goderelina (zodalex); herceptina (trastuzumab); hidroxurea (hidrea); idarubicina (idamicina); ifosfamida; IL-2 (proleucina, aldesleuquina); interferón alfa (intrón A, roferón A); irinotecán (camptosar); leuprólido (luprón); levamisol (ergamisol); lomustina (CCNU); mecloratamina (mustargen, mostaza de nitrógeno); melfalán (alqueran); mercaptopurina (purinetol, 6-MP); metotrexato (mexato); mitomicina-C (mutamucina); mitoxantrona (novantrona); octreótida (sandostatina); pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent); plicamicina (mitramicina, mitracina); prorarbazina (matulano); estreptozacona; tamoxifeno (nolvadex); taxol (paclitaxel); tenipósido (vurmon, VM-26); tiotepa; topotecán (hicamtin); tretinoína (vesanoide, ácido retinoico todo trans); vinblastina (valbán); vincristina (oncovin) y vinorelbina (navelbina). En una forma de realización, el compuesto quimioterapéutico se selecciona de fludarabina y taxanos, tales como taxol, paclitaxel y docetaxel, en particular fludarabina.

ES 2 344 566 T3

En una variante, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos oligoméricos y (b) uno o más de otros compuestos quimioterapéuticos que funcionan mediante un mecanismo que no es antisentido. Cuando se usa con los compuestos de la invención, dichos compuestos quimioterapéuticos pueden usarse de forma individual (p. ej., mitramicina y oligonucleótido), secuencialmente (p. ej., mitramicina y oligonucleótido durante un periodo de tiempo, seguido por otro agente y oligonucleótido) o en combinación con uno o más de dichos compuestos quimioterapéuticos o en combinación con radioterapia. Todos los compuestos quimioterapéuticos conocidos para un experto en la técnica, incluidos los mencionados explícitamente en lo que antecede y que se incorporan en el presente documento como tratamientos de combinación con un compuesto de acuerdo con la invención.

En una variante, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos oligoméricos y (b) uno o más compuestos anticuerpos. A esta combinación también se pueden añadir uno o más compuestos quimioterapéuticos.

En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica se administra en combinación con un compuesto seleccionado de compuestos de fludarabina y taxano.

El término "compuesto de taxano" está destinado a abarcar paclitaxel (Taxol[®]), derivados de paciitaxei, docetaxel, taxotere, taxanos modificados y análogos taxoides. Paclitaxel (Taxol[®]) es un diterpeno aislado de la corteza del tejo occidental (pacífico), *Taxus brevifolia*, y es representativo de una clase de agentes terapéuticos que tienen un sistema de anillo de taxano. Paclitaxel y sus análogos se han producido mediante síntesis parcial a partir de 10-deacetilbacatina III, un precursor obtenido de las agujas y ramas del tejo, y mediante síntesis total. Véase Holton, y col., *J. Am. Chem. Soc.* 116:1597-1601 (1994) y Nicolaou, y col., *Nature* 367:630 (1994). Paclitaxel ha mostrado eficacia en varios tumores humanos en los ensayos clínicos. Véase McGuire, y col., *Ann. Int. Med.* 111:237-279 (1989); Holmes, y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 83:1797-1805 (1991); Kohn y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 86:18-24 (1994); y Kohn, y col., *American Society for Clinical Oncology* 12 (1993). El taxano modificado o análogos de taxoides son los compuestos que tienen un anillo de taxano que porta cadenas laterales modificados. Una serie de estos análogos poseen mejores propiedades, tales como mayor solubilidad y estabilidad en agua que las del paclitaxel natural. Estos análogos son conocidos para los expertos en la técnica y se divulgan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.278.324; 5.272.171; 5.254.580; 5.250.683; 5.248.796; y 5.227.400. Paclitaxel y taxotere se pueden preparar mediante los procedimientos del documento WO 93/18210, el documento EP 0 253 739, el documento EP 0253739 y el documento WO 92/09589. En formas de realización concretas, el compuesto de taxanos es paclitaxel o taxotere.

La proporción en peso entre el(los) compuesto(s) quimioterapéutico(s) (p. ej., fludarabina y/o compuesto(s) de taxano) y el compuesto oligomérico en dicha composición está normalmente en el intervalo de 50:1 a 1:25, tal como en el intervalo de 25:1 a 1:25, o en el intervalo de 10:1 a 1:25, o en el intervalo de 1:1 a 1:25 o en el intervalo de 50:1 a 1:10 o en el intervalo de 1:1 a 1:50 o en el intervalo de 25:1 a 1:10.

En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende al menos un compuesto quimioterapéutico (p. ej., fludarabina y/o compuesto(s) de taxano) y un compuesto oligomérico como se ha definido en la presente memoria descriptiva en un transportador farmacéuticamente aceptable; en la que la proporción en peso entre el(los) compuesto(s) quimioterapéutico(s) y el compuesto oligomérico en dicha composición está en el intervalo de 50:1 a 1:25.

En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende al menos un compuesto quimioterapéutico (p. ej., fludarabina y/o compuesto(s) de taxano) y un conjugado en un transportador farmacéuticamente aceptable; en la que dicho conjugado consta de un compuesto oligomérico tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva y al menos un resto no nucleotídico/no polinucleotídico unido covalentemente a dicho compuesto oligomérico; y en la que la proporción en peso entre el(los) compuesto(s) quimioterapéutico(s) y el compuesto oligomérico parte del conjugado en dicha composición está en el intervalo de 50:1 a 1:25. En una variante dentro de esta forma de realización, el menos un resto no nucleotídico/no polinucleotídico comprende un compuesto quimioterapéutico (p. ej., fludarabina o un compuesto de taxano).

Los compuestos oligoméricos de la invención también pueden estar conjugados con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Fármacos antiinflamatorios, incluidos, entre otros, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, fármacos antivirales y fármacos inmunomoduladores, también se pueden combinar en composiciones de la invención. Dos o más compuestos combinados se pueden usar juntos o de forma secuencial.

En una forma de realización adicional, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener uno o más compuestos oligoméricos dirigidos a Bcl-2 y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Dos o más compuestos combinados se pueden usar juntos o de forma secuencial.

Además, los medicamentos que comprenden los compuestos oligoméricos se pueden usar en combinación con radioterapia etc.

ES 2 344 566 T3

Composiciones farmacéuticas preferidas

En una forma de realización, la composición farmacéutica de la invención es una composición farmacéutica líquida que comprende un compuesto oligomérico de la invención, en el que dicho transportador acuoso comprende un tampón para mantener el pH en el intervalo de 4,0-8,5 y que tiene una fuerza iónica de 20-2000 mM.

En otra forma de realización, la composición farmacéutica de la invención es una composición farmacéutica líquida que comprende un conjugado en un transportador acuoso, en la que dicho conjugado está constituido por un compuesto oligomérico de la invención, dicho transportador acuoso comprende un tampón para mantener el pH en el intervalo de 4,0-8,5 y que tiene una fuerza iónica de 20-2000 mM.

Preferentemente, dicha composición comprende además al menos un compuesto quimioterapéutico (p. ej., fludarabina y/o compuesto(s) de taxano). Como se ha mencionado en lo que antecede, la proporción en peso entre el(los) compuesto(s) quimioterapéutico(s) y el oligonucleótido LNA parte del conjugado en dicha composición normalmente está en el intervalo de 50:1 a 1:25.

En una forma de realización adicional, la composición farmacéutica de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto quimioterapéutico (p. ej., fludarabina y/o compuesto(s) de taxano) y un compuesto oligomérico de la invención, en la que la proporción en peso entre el(los) compuesto(s) quimioterapéutico(s) y el oligonucleótido LNA en dicha composición está en el intervalo de 50:1 a 1:25.

En una forma de realización adicional más, la composición farmacéutica de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto quimioterapéutico (p. ej., fludarabina y/o compuesto(s) de taxano) y un conjugado en un transportador farmacéuticamente aceptable, en la que dicho conjugado está constituido por un compuesto oligomérico de la invención, en la que la proporción en peso entre el(los) compuesto(s) quimioterapéutico(s) y el oligonucleótido LNA parte del conjugado en dicha composición está en el intervalo de 50:1 a 1:25.

Indicaciones

La Bcl-2 está implicada en una serie de mecanismos biológicos básicos, incluidos la proliferación de eritrocitos, la proliferación celular, el metabolismo de los iones, el metabolismo de la glucosa y la energía, la regulación del pH y el metabolismo de la matriz. Los procedimientos de la invención se emplean, preferentemente, para el tratamiento, tratamiento de mantenimiento o profilaxis frente a enfermedades causadas por cáncer, particularmente para el tratamiento del cáncer asociado con la expresión de Bcl-2, tales como cáncer de mama, de colon, de próstata, de páncreas, de pulmón, de hígado, de tiroides, de riñón, de cerebro, de testículos, de estómago, de intestino, intestinal, de médula espinal, de senos, de vejiga urinaria, de tracto urinario, de ovarios, de cabeza y cuello, hematológico, de piel, gástrico o de huesos.

Los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva pueden usarse en un procedimiento de prevención, tratamiento de mantenimiento o tratamiento del cáncer, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto oligomérico que modula la Bcl-2, en un ser humano. El compuesto de la invención puede además usarse durante un corto periodo de administración de un compuesto oligomérico que modula la Bcl-2. Las células normales no cancerosas se dividen a una frecuencia característica para el tipo celular concreto. Cuando una célula se ha transformado en un estado canceroso tiene como resultado una proliferación celular incontrolada y reducción de la muerte celular, y, por tanto, la división celular o el crecimiento celular promiscuos es una característica de un tipo de célula cancerosa. Ejemplos de tipos de cáncer incluyen, entre otros, linfomas y leucemias (p. ej., linfoma no Hodgkin, linfoma Hodgkin, leucemia aguda tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloides crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple), carcinoma de clon, carcinoma rectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, criocarcinoma, cáncer cervical, cáncer de testículos, carcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga urinaria, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cánceres de sitio primario desconocido, neoplasias, cánceres del sistema nervioso periférico, cánceres del sistema nervioso central, diferentes tipos de tumores (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma sinovioma, mesotelioma, tumor de Swing, leiomiomasarcoma, rabiomiomasarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, carniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma y retinoblastoma), enfermedad de las cadenas pesadas, metástasis, o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular anormal o incontrolado.

Los linfomas no Hodgkin de la invención comprenden, entre otros, linfoma de células precursoras tal como linfoma linfoblástico (células T y células B); neoplasias de células B periféricas, tales como leucemia linfocítica crónica de células B y linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células de Mantel, linfoma folicular, linfoma de células B de la zona marginal extraganglionar de tipo MALT, linfoma de células B de la zona marginal ganglionar, linfoma de células B de la zona marginal esplénica,

ES 2 344 566 T3

leucemia de células peludas, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, incluido el linfoma similar al Burkitt, plasmacitoma y mieloma de células plasmáticas; neoplasias de células T y NK periféricas, tales como leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T, leucemia agresiva de células NK, micosis fungoides y síndrome de sezary, linfoma de células T periféricas, linfoma de células T angioinmunoblástico, 5 linfoma de células NK/T extraganglional (nasal y de tipo nasal), linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma de células T $\gamma\delta$ hepatoesplénico, linfoma de células T similar a paniculitis subcutánea (células nulas/T, tipo cutáneo primario) y linfoma de células T del adulto y leucemia (HTLV1+).

10 Actualmente se cree que los tipos de cáncer para los que se pueden conseguir resultados clínicos particularmente buenos son leucemia mielóide aguda, leucemia linfocítica crónica y linfomas no Hodgkin particularmente linfoma folicular y linfoma difuso de células B grandes.

15 El término “carcinoma” está destinado para indicar un tumor maligno de origen epitelial. El tejido epitelial cubre u reviste las superficies corporales dentro y fuera del cuerpo. Ejemplos de tejido epitelial son la piel y la mucosa y la serosa que revisten las cavidades del cuerpo y los órganos internos, tales como los intestinos, la vejiga urinaria, el útero, etc. El tejido epitelial también puede extenderse a capas tisulares más profundas para formar glándulas, tales como glándulas secretoras de moco.

20 El término “sarcoma” está destinado para indicar un tumor maligno en crecimiento a partir del tejido conjuntivo, tal como cartílago, grasa, músculos, tendones y huesos.

El término “glioma”, cuando se usa en la presente memoria descriptiva, está destinado a cubrir un tumor maligno que se origina a partir de células gliales.

25 *Usos*

Los compuestos oligoméricos de la presente invención se pueden utilizar como terapéuticas, tratamiento de mantenimiento y profilaxis. En investigación, los compuestos oligoméricos antisentido se pueden usar para inhibir específicamente la síntesis de la proteína Bcl-2 en células y animales experimentales, de modo que se facilita el análisis funcional del la diana o una evaluación de su utilidad como diana para la intervención terapéutica. Para las terapéuticas, un animal o un ser humano (en particular un ser humano) del que se sospecha que presenta una enfermedad o trastorno, que se puede tratar mediante modulación de la expresión de Bcl-2 es tratado mediante la administración de compuestos antisentido de acuerdo con la presente invención.

35 La invención proporciona además un procedimiento para modular la expresión de Bcl-2 en células o tejido, en el que el procedimiento comprende poner en contacto dichas células tejido con un compuesto oligomérico o un conjugado tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva, en particular una composición farmacéutica tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva, de forma que se modula la expresión de Bcl-2.

40 Además, la invención proporciona un procedimiento para modular la expresión de un gen implicado en una enfermedad cancerosa que comprende poner en contacto el gen o el ARN del gen con un compuesto oligomérico o un conjugado tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva, en particular una composición farmacéutica tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva, de modo que se modula la expresión génica. Preferentemente, el gen es el gen Bcl-2 humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de inducción de apoptosis celular que comprende poner en contacto la célula o el ARN de la célula con un compuesto oligomérico o un conjugado tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva, en particular una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria descriptiva, de modo que se induce la apoptosis. La inducción de apoptosis es *in vitro*. La inducción se puede provocar en un ensayo celular o dentro de una muestra tisular.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de prevenir o reducir la proliferación celular que comprende poner en contacto la célula o el ARN de la célula con un compuesto oligomérico o un conjugado tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva, en particular una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria descriptiva, de modo que se previene o reduce la proliferación celular. La prevención o reducción de la proliferación es *in vitro*. La prevención puede realizarse en un ensayo celular o dentro de una muestra de tejido.

60 En una forma de realización, el tratamiento se combina con la administración de un agente adicional seleccionado del grupo constituido por compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivirales, compuestos citostáticos, compuestos antiangiogénicos, compuestos antiproliferativos, compuestos proapoptóticos, moduladores de la transducción de la señal e inhibidores de la quinasa. En una variante concreta, el agente adicional es al menos un agente quimioterapéutico, en particular uno o más de los agentes quimioterapéuticos específicos mencionados en lo que antecede.

65 Además, la invención proporciona los compuestos oligoméricos tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva para usar como un medicamento. Más particularmente, la invención proporciona el uso de un compuesto

ES 2 344 566 T3

oligomérico como se ha definido en la presente memoria descriptiva para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cancerosa. El medicamento está, preferentemente, en forma de una composición farmacéutica tal como se ha definido en lo que antecede.

5 Por tanto, otro aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un compuesto oligomérico tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un mamífero, en particular un ser humano, que sufre o es susceptible de sufrir una enfermedad cancerosa.

10 En una forma de realización, el(los) compuesto(s) quimioterapéutico(s) está/n presente en la primera composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido LNA.

15 En una forma de realización, uno o más compuestos quimioterapéuticos (p. ej., fludarabina y/o compuesto(s) de taxano) está/n presentes en una segunda composición farmacéutica que no comprende el oligonucleótido LNA. En este caso, la primera composición farmacéutica y la segunda composición farmacéutica se pueden administrar de forma concomitante o se pueden administrar secuencialmente.

20 En general, el medicamento puede además comprender otro agente seleccionado del grupo constituido por compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivirales, compuestos citostáticos, compuestos antiangiogénicos, compuestos antiproliferativos, compuestos proapoptóticos, moduladores de la transducción de la señal e inhibidores de la quinasa. En una variante concreta, el agente adicional es al menos un compuesto quimioterapéutico, en particular uno o más de los compuestos quimioterapéuticos específicos mencionados en lo que antecede.

25 Las enfermedades cancerosas a las que se ha hecho referencia en lo que antecede son, en particular, cáncer de pulmón, de mama, de colon, de próstata, de páncreas, de pulmón, de hígado, de tiroides, de riñón, de cerebro, de testículos, de estómago, de intestino, intestinal, de médula espinal, de senos, de vejiga urinaria, de tracto urinario, de ovarios, de cabeza y cuello, hematológico o de piel, como se describe con más detalle en lo que antecede.

30 Además, la presente invención proporciona un complejo que comprende un compuesto hibridado con un ácido ribonucleico que codifica una proteína Bcl-2 humano, en el que dicho compuesto es un compuesto oligomérico o un conjugado tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva. Dichos complejos pueden ser el resultado del tratamiento de una diana, es decir un ácido ribonucleico que codifica la proteína Bcl-2 humana, con un compuesto oligomérico o conjugado como se ha definido en la presente memoria descriptiva.

35

Administración

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de una serie de modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. La administración puede ser administración 40 (a) oral (b) pulmonar, por ejemplo mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluido mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, (c) tópica, incluidas las administraciones epidérmicas, transdérmicas, oftálmicas y en las membranas mucosas, incluida administración vaginal y rectal; o (d) parenteral, incluida la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo administración intratecal o intraventricular. En una forma de realización, el compuesto oligomérico se administra por vía IV, IP, oral, 45 tópica o en forma de inyección en bolo, o se administra directamente en el órgano diana.

50 Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, atomizadores, supositorios, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables transportadores farmacéuticos convencionales, acuosos, polvo o bases oleosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos, guantes revestidos y similares. Formulaciones tópicas preferidas incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención están en mezcla con un agente de liberación tópica tales como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen, entre otros, polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, sellos, comprimidos o minicomprimidos. 55 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que pueden también contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, entre otros, potenciadores de la penetración, compuestos transportadores y otros transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

60

Suministro

65 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, entre otras, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, entre otros, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. La liberación del fármaco al tejido tumoral puede potenciarse mediante liberación mediada por transportador incluidos, entre otros, liposomas cariónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilimina, nanopartículas y microsferas (Dass CR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27).

ES 2 344 566 T3

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar de forma conveniente en forma de monodosis, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con el(los) transportador(es) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha los ingredientes activos con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o con ambos y, después, en caso necesario, dando forma al producto.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles, tales como, entre otros, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular en forma de suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, incluidas, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

15 *Dosificación*

La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado de enfermedad que se va a tratar y el curso de tratamiento que dura de varios días a varios meses o hasta que se efectúa una cura y se consigue una disminución del estado de la enfermedad. Los programas de dosificación óptimos dependerán de, por ejemplo, la elección del tratamiento de combinación, la enfermedad y el estado de la enfermedad y los resultados de los ensayos clínicos iniciales.

Las dosificaciones óptimas pueden variar en función de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales. En general, se puede estimar sobre la base de las CE50 que se ha encontrado que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 μg a 1 g por kg de peso corporal y se puede administrar una o más veces al día, a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada de 2 a 10 años o mediante infusión continua durante de horas a varios meses. Las tasas de repetición para la administración de la dosis se pueden estimar sobre la base de los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales.

Tras un tratamiento con éxito, puede ser deseable someter al paciente a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de la enfermedad.

Sin pretender quedar ligado a teoría alguna concreta, se prevé que el efecto combinado (y efecto potencialmente sinérgico) de un compuesto quimioterapéutico y un compuesto oligomérico de acuerdo con la invención posibilitará reducir la dosificación del compuesto quimioterapéutico o el compuesto oligomérico, o ambos.

40 *Un kit*

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit que comprende

- (a) un primer componente que contiene una o más dosis de solución inyectable de un compuesto oligomérico de acuerdo con la invención, y
- (b) un segundo componente que contiene una o más soluciones inyectables de uno o más compuestos quimioterapéuticos (p. ej., fludarabina y/o compuesto(s) de taxano); y

en el que la proporción en peso entre el al menos un compuesto de taxano y el al menos un oligonucleótido LNA en dicha composición está en el intervalo de 50:1 a 1:25.

Preferentemente, las dosis de solución inyectable de un compuesto oligomérico son composiciones farmacéuticas como se ha definido en lo que antecede.

55 **Ejemplos**

Ejemplo 1

60 *Síntesis de monómero*

Los bloques componentes monoméricos de LNA y sus derivados se prepararon siguiendo los procedimientos publicados y las referencias citadas en ellos, véase:

65 Documento WO 03/095467 A1

D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, I. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, *Synthesis* 6, 802-808.

ES 2 344 566 T3

M. D. Sørensen, Kvaernø, T. Bryld, A. E. Hakansson, B. Verbeure, G. Gaubert, P. Herdewijn, J. Wengel (2002) α -L-ribo-configured Locked Nucleic Acid (α -LNA): Synthesis and Properties, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 2164-2176.

5 S. K. Singh, R. Kumar, J. Wengel (1998) Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino-and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 6078-6079.

C. Rosenbohm, S. M. Christensen, M. D. Sørensen, D. S. Pedersen, L. E. Larsen, J. Wengel, T. Koch (2003) Synthesis of 2'-amino-LNA: a new strategy, *Org. Biomol. Chem.* 1, 655-663.

10 D. S. Pedersen, T. Koch (2003) Analogues of LNA (Locked Nucleic Acid). Synthesis of the 2'-Thio-LNA Thymine and 5-Methyl Cytosine Phosphoramidites, Synthesis, aceptado.

15 Ejemplo 2

Síntesis de oligonucleótidos

Síntesis de oligonucleótidos a pequeña escala

20 Los oligonucleótidos se sintetizaron usando el enfoque de fosforoamidita en un sintetizador Expedite 8900/MOSS (Multiple Oligonucleotide Syntheses System) a una escala de 1 μ mol o 15 μ mol. Para la síntesis a mayor escala se usó un Akta Oligo Pilot. Al final de la síntesis (con DMT) los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido usando amoniaco acuoso durante 1-2 horas a temperatura ambiente y se desprotegeron adicionalmente durante 4
25 horas a 65°C. Los oligonucleótidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Después de la retirada del grupo DMT, los oligonucleótidos se caracterizaron por AE-H PLC, RP-H PLC y CGE y la masa molecular se confirmó adicionalmente mediante ESI-MS. Véase más adelante para más detalles.

30 *Preparación del soporte sólido de LNA*

Preparación del hemiéster de succinilo de LNA

35 El monómero 5'-O-Dmt-3'-hidroxi-LNA (500 mg), anhídrido succínico (1,2 eq.) y DMAP (1,2 eq.) se disolvieron en DCM (35 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de las extracciones con NaH₂PO₄ 0,1 M a pH 5,5 (2 veces) y salmuera (1 vez), la capa orgánica se secó adicionalmente con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó. El derivado hemiéster se obtuvo con un rendimiento del 95% y se usó sin purificación adicional.

40 *Preparación del soporte de LNA*

45 El derivado hemiéster preparado en lo que antecede (90 μ mol) se disolvió en una cantidad mínima de DMF, se añadieron DIEA y pyBOP (90 μ mol) y se mezclaron durante 1 minuto. Esta mezcla preactivada se combinó con LCAA-CPG (500 Å, 80-120 de tamaño de malla, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó. Después de 1,5 horas a temperatura ambiente, el soporte se filtró y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Después de secar, se determinó que la carga era 57 μ mol/g (véase, Tom Brown, Dorcas J. S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. En: F. Eckstein, editor. Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14).

50 *Elongación del oligonucleótido*

55 El acoplamiento de fosforoamiditas (A(bz), G(ibu), 5-metil-C(bz)) o T- β -cianoetilfosforoamidita) se realiza usando una solución de 0,1M de la amidita protegida con 5'-O-DMT en acetonitrilo y DCI (4,5-dicianoimidazol) en acetonitrilo (0,25M) como activador. La tiolación se realiza usando hidruro de xantano (0,01M en acetonitrilo:piridima 10%). El resto de los reactivos son los normalmente usados para la síntesis de oligonucleótidos. El protocolo proporcionado por el suministrados se optimizó convenientemente.

60 *Purificación mediante RP-HPLC*

Columna: Xterra RP₁₈

Caudal: 3 ml/min

65 Tampones: Acetato amónico 0,1M a pH 8 y acetonitrilo

ES 2 344 566 T3

Abreviaturas

	DMT:	Dimetoxitritilo
5	DCI:	4,5-dicianoimidazol
	DMAP:	4-Dimetilaminopiridina
	DCM:	Diclorometano
10	DMF:	Dimetilformamida
	THF:	Tetrahidrofurano
15	DIET:	N,N-diisopropiletilamina
	PyBOP:	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
20	Bz:	Benzoílo
	Ibu:	Isobutirilo

Síntesis de oligonucleótidos a gran escala

25 Se sintetizaron oligonucleótidos a gran escala usando el enfoque de fosforoamidita en un oligopilot AKTA a escalas de 200 μ mol a 1 mmol. Después de la síntesis sin DMT del oligo y tras el tratamiento con DEA, también se realizó en el sintetizador. La escisión del oligonucleótido del soporte sólido y la eliminación de los grupos protectores se realizó mediante tratamiento con amoniaco acuoso durante 12 horas a 55°C. Los oligonucleótidos se purificaron
30 después mediante intercambio iónico (IEX) en un piloto AKTA. La desalación se realizó en medio Sephadex™ G-25 tras liofilización. Los oligonucleótidos se caracterizaron mediante IEX-HPLC, CGE y ESI-MS.

35 El acoplamiento de ADN-fosforoamiditas (A(bz), C(bz), G(ibu) y (T)) y LNA-fosforoamiditas (C(bz) y (T)) se realiza usando una solución 0,2M de la amidita en acetonitrilo y una 0,75M de DCI (4,5-dicianoimidazol) como activador. La tiolación se realiza usando hidruro de xantano (0,0175 M en acetonitrilo:piridina 20%). El resto de los reactivos son los normalmente usados para la síntesis de oligonucleótidos.

Ejemplo 3

40 Diseño del compuesto oligomérico

45 TABLA 1

Compuestos oligoméricos de la invención

50 En la presente solicitud, a los compuestos oligoméricos se hace referencia mediante el número de secuencia especificada, por ejemplo "SEC ID N° 15". El compuesto "SEC ID N° 56" también se denomina oblimersen sódico y se usa en la presente memoria descriptiva como un compuesto de referencia.

SEQ ID N°:	Secuencia	Diseño
	18 mers complementarios	
1	T _s C _s t _s C _s c _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 13

ES 2 344 566 T3

2	T _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s c _s g _s t _s g _s c _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 11
3	T _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s A _s t	hueco 9
4	t _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s c _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 10
5	T _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s A _s T	hueco 11
6	T _s ^α C _s ^α T _s ^α C _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s ^α C _s ^α A _s ^α t	hueco 11
7	t _s C _s ^α T _s ^α C _s ^α C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s ^α C _s ^α A _s ^α t	hueco 10
	16 mers complementarios	
8	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	hueco 11
9	C _s ^α T _s ^α C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s ^α C _s ^α C _s ^α a	hueco 11, α-L-LNA
10	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A	LNA extremo 3'
11	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A	LNA extremo 3'
12	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 9
13	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 7
14	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s A	hueco 9
	c_st_sc_sc_sc_sa_sM_sc_sg_st_sg_sc_sg_sc_sc_sa, 16mers	
15	C _s T _s C _s C _s C _s a _s a _s c _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	hueco 11
16	C _s ^α T _s ^α C _s C _s C _s a _s a _s c _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s ^α C _s ^α a	hueco 11, α-L-LNA
17	C _s T _s C _s C _s C _s a _s a _s c _s g _s t _s g _s G _s C _s C _s a	hueco 9
18	C _s T _s C _s C _s C _s a _s t _s c _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 9
19	C _s T _s C _s C _s C _s a _s a _s c _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 7
20	C _s T _s C _s C _s C _s a _s a _s c _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 10
	c_st_sc_sc_sc_sa_sg_sc_sg_sM_sg_sc_sg_sc_sc_sa, 16mers	
21	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s C _s g _s C _s g _s C _s C _s a	hueco 11
22	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s C _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 9
23	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s C _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 7
24	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s a _s g _s C _s C _s C _s a	hueco 11
25	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s g _s C _s g _s C _s C _s a	hueco 11
	t_sc_st_sc_sc_sc_sa_sg_sM_sg_st_sg_sC_sg_sc_sc_sa,t, 18mers	
26	TC _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s a _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 11
27	TC _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s t _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 11
28	TC _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s g _s t _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 11
	Patrones	
29	C _s T _s C _s C _s C _s a _s a _s c _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C	N-1, extremo 3'
30	C _s T _s C _s C _s C _s a _s a _s c _s g _s t _s g _s C _s g _s C	N-2, extremo 3' (ref.)

ES 2 344 566 T3

	31	C _s T _s C _s C _s C _s a _s a _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s	N-3, extremo 3' (ref.)
	32	T _s C _s C _s C _s C _s a _s a _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	N-1, extremo 5' (ref.)
5	33	c _s C _s C _s C _s a _s a _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	N-2, extremo 5' (ref.)
	34	c _s C _s a _s a _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	N-3, extremo 5' (ref.)
	35	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C	N-1, extremo 3'
10	36	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C	N-2, extremo 3' (ref.)
	37	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s	N-3, extremo 3' (ref.)
	38	T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	N-1, extremo 5' (ref.)
15	39	c _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	N-2, extremo 5' (ref.)
	40	c _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	N-3, extremo 5' (ref.)
20	41	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 12
	42	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 10
	43	C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s A _s t	hueco 8
25	44	T _s C _s t _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a	hueco 12
	45	T _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 10
	46	T _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s a	hueco 8
30	47	T _s C _s t _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s c	hueco 11
	48	T _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s c	hueco 9
	49	T _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s G _s C _s G _s C _s c	hueco 7
35	50	T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 11
	51	T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 9
40	52	T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s G _s C _s C _s A _s t	hueco 7
	53	TC _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s a _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 11
	54	TC _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s t _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 11
45	55	TC _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s C _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s A _s t	hueco 11
	56	t _s C _s t _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s C _s C _s a _s t	Referencia
	57	T _s C _s T _s C _s C _s C _s a _s g _s C _s a _s t _s g _s t _s g _s C _s C _s A _s t	2 faltas de coincidencia
50	58	A _s C _s C _s g _s C _s g _s t _s g _s C _s g _s a _s C _s C _s C _s T _s c	Referencia: polaridad invertida
	59	t _s ^m C _s t _s ^m C _s ^m C _s ^m C _s a _s g _s ^m C _s g _s t _s g _s ^m C _s g _s ^m C _s ^m C _s a _s t	Referencia
55	60	C _s T _s C _s C _s C _s a _s C _s ^m g _s t _s g _s ^m g _s C _s C _s a	hueco 11
	61	C _s T _s ^m C _s ^m C _s ^m C _s a _s ^m C _s g _s t _s g _s ^m C _s g _s C _s C _s a	hueco 11
60		Cebadores	
	62	catgtgtgtggagagcgtcaa	
	63	gccggttcaggtactcagtca	
65	64	FAM -cctggtggacaacatcgccctgt-TAMRA	

ES 2 344 566 T3

En la tabla 1, las letras mayúsculas indican nucleótidos LNA, el superíndice “ α ” indica que el nucleótido LNA es un nucleótido alfa-L-LNA (es decir, un nucleótido análogo LNA) y el subíndice “S” indica que los nucleótidos adyacentes están unidos por un grupo fosforotioato. Todos los monómeros de LNA-C son metil-C.

5

Ejemplo 4

Modelo in vitro: Cultivo celular

10 El efecto de los compuestos antisentido sobre la expresión del ácido nucleico diana se puede investigar en cualquiera de una variedad de tipos celulares, con la condición de que el ácido nucleico diana esté presente a niveles mensurables. La diana se puede expresar de forma endógena o mediante transfección transitoria o estable de un ácido nucleico que codifica dicho ácido nucleico.

15 El nivel de expresión del ácido nucleico diana se puede determinar de forma rutinaria usando, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo northern, PCR cuantitativa, ensayos de protección de ribonucleasa u otros procedimientos cuantitativos. Los siguientes tipos celulares se proporcionan con fines ilustrativos, pero se pueden utilizar otros tipos celulares de forma rutinaria, siempre que la diana se exprese en el tipo celular escogido.

20 Las células se cultivaron en el medio adecuado tal como se describe a continuación y se mantuvieron a 37°C a una humedad del 95-98% y 5% de CO₂. Las células se pasaron de forma rutinaria 2-3 veces a la semana.

25 15PC3: La línea celular de cáncer de próstata humano 15PC3 fue donada amablemente por el Dr. F. Baas, Neurozintuigen Laboratory, AMC, Países Bajos y se cultivó en DMEM (Sigma) + 10% de suero bovino fetal (FBS) + Glutamax I + gentamicina.

PC3: La línea celular de cáncer de próstata humano PC3 se adquirió de la ATCC y se cultivó en medio de Coon con glutamina (Gibco) + 10% FBS + gentamicina.

30 518A2: La línea celular de cáncer de melanoma humano 518A2 fue donada amablemente por el Dr. B. Jansen, Section of experimental Oncology, Molecular Pharmacology, Department of Clinical Pharmacology, University of Vienna y se cultivó en DMEM (Sigma) + 10% de suero bovino fetal (FBS) + Glutamax I + gentamicina.

35 Ejemplo 5

Modelo in vitro: Tratamiento con oligonucleótido antisentido

40 Las células se trataron con oligonucleótido usando la formulación de liposoma catiónico LipofectAMINE 2000 (Gibco) como vehículo de transfección.

45 Las células se sembraron en placas de cultivo celular de 12 pocillos (NUNC) y se trataron a confluencia del 80-90%. Las concentraciones de oligómeros usadas variaron de 0,2 mM a 100 nM de concentración final. La formulación de complejos oligómero-lípido se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito en Dean y col. (Journal of Biological Chemistry 1994, 269, 16416-16424) usando OptiMEM (Gibco) sin suero y una concentración lipídica final de 10 µg/ml de LipofectAMINE 2000 en 500 µl de volumen total.

50 Las células se transfeccionaron mediante incubación a 37°C durante 4 horas. Posteriormente, se retiró el medio de transfección y las células se lavaron antes de añadir el medio que contenía suero. Las células se cultivaron durante diferentes duraciones de tiempo que varían de 0-72 horas.

Ejemplo 6

55 *Modelo in vitro: Extracción de ARN y síntesis de ADNc*

Aislamiento de ARN total

60 El ARN total se aisló usando el kit RNeasy mini kit (Qiagen nº de cat. 74104) o el reactivo Trizol Life technologies nº de cat. 15596). Para el aislamiento del ARN de líneas celulares, RNeasy es el procedimiento preferido y para las muestras tisulares Trizol es el procedimiento preferido.

65 El ARN total se aisló de líneas celulares usando the Qiagen RNA OPF Robot -BIO Robot 3000 de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante.

Las muestras de tejido se homogeneizaron y el ARn total se aisló usando el protocolo del reactivo Trizol proporcionado por el fabricante.

ES 2 344 566 T3

Síntesis de la primera hebra

La síntesis de la primera hebra se realizó usando el kit Reverse Transcriptase kit (n° de cat. 205113, Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5

Para cada muestra, 0,5 µg del ARN total se ajustó a 12 µl cada uno con N2O SIN ARNasa y se mezcló con 2 µl de poli(dT)12-18 (2,5 µg/ml) (Life Technologies, GibcoBRL, Roskilde, DK), 2 µl de mezcla de Dntp (5 mM de cada dNTP), 2 µl de 10x tampón a TA, 1 µl de INHIBIDOR RNAGuard™Rnase (33,3 U/ml), (n° de cat. 27-0816-01, Amersham Pharmacia Biotech, Hørsholm, DK) y 1 µl de transcriptas inversa OmniScript (4 U/µl) seguido por la incubación a 37°C durante 60 minutos e inactivación con calor de la enzima a 93°C durante 5 minutos.

10

Ejemplo 7

15 *Modelo in vitro: Análisis de la inhibición oligonucleotídica de la expresión de Bcl-2 mediante PCR en tiempo real*

La modulación antisentido de la expresión de Bcl-2 se puede analizar de diversos modos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm de Bcl-2 se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo Northern o PCR cuantitativa. Actualmente se prefiere la PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis del ARN se puede realizar sobre el ARN o ARNm celular total.

20

Los procedimientos de aislamiento del ARN y los análisis de ARN tales como el análisis de transferencia tipo northern son rutinarios en la técnica y se enseñan en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

25

La (PCR) cuantitativa en tiempo real se pueden realizar convenientemente usando el sistema de detección de PCR en tiempo real y multicolor IQ disponible comercialmente en BioRAD Laboratories.

30 *Análisis con PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm de Bcl-2*

La cuantificación de los niveles de ARNm se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de PCR en tiempo real y multicolor IQ (BioRAD) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

35

La PCR cuantitativa en tiempo real es una técnica bien conocida en la técnica y se enseña en, por ejemplo, Heid y col. Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994.

Platinum Quantitative PCR SuperMix UDG 2x PCR master mix se obtuvo en Invitrogen n° de cat. 11730. Los cebadores y las sondas TaqMan® se obtuvieron en MWG-Blotech AG, Ebersberg, Alemania.

40

Las sondas y los cebadores para la Bcl-2 humana se diseñaron para hibridar con una secuencia de Bcl-2 humana usando la información de la secuencia publicada.

Para la Bcl-2 humana, los cebadores para PCR fueron: cebador directo: 5' catgtgtgtggagagcgtcaa 3' (concentración final en el ensayo; 0,6 µM (SEC ID N° 62) cebador inverso: 5' gccggttcaggtactcagca 3' (concentración final en el ensayo; 0,6 µM (SEC ID N° 63) y la sonda de PCR fue: 5' FAM-cctggttgacaacatcgccctgt-TAMRA 3' (concentración final en el ensayo; 0,1 µM (SEC ID N° 64)

45

La cantidad de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) se usó como control endógeno para normalizar cualquier variación en la preparación de muestras.

50

El contenido de la muestra de ARNm de GAPDH humano se cuantificó usando el ensayo GAPDH ABI Prism Pre-Developed TaqMan Assay Reagent (Applied Biosystems n° de cat. 431 0884E) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55

PCR en tiempo real

El ADNc de la síntesis de la primera hebra realizada tal como se ha descrito en lo que antecede en el presente documento se diluyó 2-20 veces y se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los cebadores y las sondas se mezclaron con 2 x Platinum Quantitative PCR SuperMix UDG (n° de cat. 11730, Invitrogen) y se añadieron a 3,3 µl de ADNc hasta un volumen final de 25 µl. Cada muestra se analizó por triplicado. El ensayo de diluciones del doble de un ADNc que se había preparado con material purificado de una línea celular que expresa en ARN de interés generó curvas estándar para los ensayos. Se usó H₂O estéril en lugar de ADNc para el control no molde. Programa de PCR: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C, 15 segundos, 60°C, 1 minuto.

65

Las cantidades relativas de la secuencia de ARNm diana se determinaron a partir del ciclo umbral calculado usando el software del sistema de detección en tiempo real iCycler iQ. (Véase la Tabla 3).

ES 2 344 566 T3

Ejemplo 8

Análisis in vitro: Análisis de transferencia tipo western de los niveles de la proteína Bcl-2

5 Los niveles proteicos de Bcl-2 se pueden cuantificar de varias maneras conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia de tipo western (inmunotransferencia), ELISA, RIA (radioinmunoensayo) o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y otros. Se pueden identificar los anticuerpos dirigidos a Bcl-2 y se pueden obtener de diversas fuentes, tales como Upstate Biotechnologies (Lake Placid, EE.UU.), Novus Biologicals (Littleton, Colorado), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California), DAKO (Glostrup, Dinamarca)
10 o se pueden preparar mediante procedimientos convencionales de generación de anticuerpos. Transferencia de tipo western:

El efecto de los oligos Bcl-2 sobre los niveles de la proteína Bcl-2 *in vitro* se determinó mediante transferencia de tipo western.

15 Las células se transfeccionaron tal como se ha descrito en el ejemplo 5. Las células se recogieron en los puntos de tiempo que varían de 0-72 horas tras la transfección, se lisaron en SDS al 2,5%, DTT 5 Mm y urea 6M suplementados con comprimidos de mezcla con inhibidor de la proteasa (Roche). Las concentraciones proteicas totales se midieron usando un reactivo de Bradford. 150 μ l de proteínas totales se pasaron por geles de Bis-Tris al 12% en tampón MOPS y se transfirieron a membranas de PVDF de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen).
20 Después de la incubación durante la noche en tampón de bloqueo (Invitrogen), la membrana se incubó dos horas con anticuerpos monoclonales anti-Bcl-2 (DAKO) y anti-survivina (Novus Biologicals 500-205 clon 60.11) o anti-tubulina NeoMarkers), seguido por una incubación de una hora en anticuerpos secundarios. Se usó un kit de inmunodetección cromogénico (Invitrogen) para visualizar Bcl-2, survivina o tubulina. Como alternativa, la membrana se incubó con inmunoglobulinas de ratón conjugadas con HRP (DAKO) seguido por incubación con reactivo ECL⁺ Plus (Amersham) y se visualizó usando el sistema de detección con quimioluminiscencia VersaDoc. Véanse las figuras 1, 2A, 2B y 2C.
25 La figura 6 muestra la duración de la actividad de la SEC ID ^o 15 sobre la proteína Bcl-2. La tabla 2 muestra los valores de quimioluminiscencia para un gel con 10 nM y la concentración del compuesto 10 Nm (gel no mostrado). La figura 2A muestra un gel de un experimento similar pero con otras dosis (1 nM y 5 nM).

30

TABLA 2

35	Compuesto oligomérico y concentración	Cantidad de Bcl-2 (%) normalidad para la SEC ID N ^o 56, 10 nM
40	SEC ID N ^o 56 (ref.), 10 nM	100
	SEC ID N ^o 56 (ref.), 100 nM	72
	SEC ID N ^o 2, 10 nM	33
45	SEC ID N ^o 2, 100 nM	4

Ejemplo 9

Análisis in vitro: Inhibición antisentido de la expresión de Bcl-2 humana usando oligonucleótidos antisentido

De acuerdo con la presente invención se diseñó una serie de oligonucleótidos para hibridar con una región específica del ARNm de Bcl-2 humano, es decir la región alrededor del codón de iniciación de la traducción. Los oligonucleótidos de diseño y longitud diferentes se muestran en la tabla 1. Para los compuestos oligoméricos se evaluó su potencial de suprimir la Bcl-2 en 15PC3 y 515A2 a través de la transfección en estas líneas celulares. El equilibrio del transcrito de Bcl-2 se monitorizó mediante PCR en tiempo real y se normalizó al nivel en equilibrio del transcrito de GAPDH. La tabla 3 muestra una serie de compuestos potentes en comparación con la SEC ID N^o 56 (oblimersen sódico; un fosforotioato completamente modificado; referencia).

60

65

ES 2 344 566 T3

TABLA 3

Expresión de ARNm de Bcl-2 determinada mediante PCR en tiempo real. Las células 15PC3 o 518A2 se transfecionaron con la concentración indicada del compuesto oligomérico y el ARN se extrajo tras 24 horas de incubación. La regulación por disminución se presente en relación con las tratadas de forma simulada

Línea celular:	15PC3			518A2		
SEC ID N°	Concentración (Nm)					
	1	5	25	1	5	25
56 (referencia).	0%	70%	88%		42%	66%
59 (referencia)	29%	70%	90%			
1	72%	87%	91%			
2	74%	92%	89%		72%	89%
3	34%	45%	84%			
4	53%	82%	90%		78%	90%
8	61%	80%	ND	44%	60%	82%
12	62%	92%	91%		78%	92%
13	36%	NO	60%			
15	24%	79%	89%		72%	84%
18	0%	71%	88%			
19	0%	0%	37%			
21	23%	80%	89%		74%	86%
23	45%	62%	70%			
24	39%	85%	92%		70%	82%
57	0%	37%	91%		61%	81%
16				18%	36%	68%
9				26%	ND	78%

Ejemplo 10

Inducción de la apoptosis por compuestos oligoméricos antisentido LNA

Las células se sembraron hasta una densidad de 12.000 células por pocillo en placas blancas de 96 pocillos (136101) en DMEM el día antes de la transfección. Al día siguiente las células se lavaron una vez en medio OptiMEM precalentado, seguido por la adición de 72 μ l de OptiMEM que contiene 5 μ g/ml de Lipofectamine2000 (In vitrogen). Las células se incubaron durante 7 minutos antes de añadir 18 μ l de oligonucleótidos diluidos en OptiMEM. La concentración final del oligonucleótido varió de 0,2 nM a 25 nM. Después de 4 horas de tratamiento, las células se lavaron en OptiMEM y se añadieron 50 μ l de DMEM que contiene suero. Tras el tratamiento con el compuesto oligomérico, se dejó recuperar las células durante el periodo indicado en lo que antecede y se retiraron del incubador de CO₂ y se equilibraron hasta la temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió un volumen igual de reactivo 3/7-Glo™ (Promega) altamente sensible a la caspasa directamente a las células en 96 pocillos y las placas se incubaron durante 60 minutos antes de registrar la luminiscencia (actividad luciferasa) en instrumento Luminoskan Ascent de Thermo Labsystems tras un periodo de retraso adicional de 1 minuto. La actividad luciferasa se mide como unidades lumínicas relativas por segundo (ULR/s). Los datos se procesaron en el software Ascent 2.6 y las gráficas se realizaron en excel. (Véanse las figuras 3A y 3B).

Análisis de citometría de flujo con anexina V-FITC: 0,4 x 10⁶ células HeLa se sembraron en matraces T25 un día antes de la transfección. El día de la transfección, las células se lavaron una vez en OptiMEM a 37°C, seguido por la

ES 2 344 566 T3

adición de 2,8 ml de OptiMEM que contiene 5 µg/ml de Lipofectamine2000 (In vitrogen). Las células se incubaron durante 7 minutos antes de añadir 700 µl de oligonucleótidos diluidos en OptiMEM hasta una concentración final de oligonucleótidos de 5 nM o 25 nM. Las células transfectadas sin oligonucleótido sirvieron como control. Después de 4 horas de tratamiento, las células se lavaron en OptiMEM y se añadieron 3 ml de medio de cultivo. Tras el tratamiento con oligo, se dejó recuperar las células durante 48 horas antes de que se recogieran (mediante raspado), se lavaron dos veces en PBS. $0,2 \times 10^6$ células se incubaron con 5 µl de anexina V-FITC y 10 µl de yoduro de propidio (IP-10 mg/ml) y se incubaron durante 15 minutos a TA en oscuridad.

Las células transfectadas incubadas con anexina V recombinante purificada, que bloquea la unión de la anexina V antes de añadir anexina V-FITC se usaron para demostrar especificidad y selectividad en la tinción. Además, las células HeLA (0,5 µg/ml) inducidas con TRAIL (Apo2L) se usaron como control positivo (datos no mostrados). (Véanse las figuras 3C y 3D)

Ejemplo 11

Inhibición con oligonucleótidos antisentido de Bcl-2 en células cancerosas en proliferación

Las células se sembraron hasta una densidad de 12000 células por pocillo en placas blancas de 96 pocillos (136101) en DMEM el día antes de la transfección. Al día siguiente las células se lavaron una vez en medio OptiMEM precalentado, seguido por la adición de 72 µl de OptiMEM que contiene 5 µg/ml de Lipofectamine2000 (In vitrogen). Las células se incubaron durante 7 minutos antes de añadir 18 µl de oligonucleótidos diluidos en OptiMEM. La concentración final del oligonucleótido varió de 5 nM a 100 nM. Después de 4 horas de tratamiento, las células se lavaron en OptiMEM y se añadieron 100 µl de DMEM que contiene suero. Tras el tratamiento con el compuesto oligomérico, las células se dejaron recuperar durante el periodo indicado, las células viables se midieron mediante la adición de 20 µl del compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina, PES) (CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) por 100 µl de DMEM. Las células viables se midieron a 490 nm en un Powerwave (Biotek Instruments). Las tasas de crecimiento (AOD/h) se representaron frente a la concentración del compuesto oligomérico (véanse las Figuras 4 y 5).

Ejemplo 12

Modelo in vivo: Inhibición del crecimiento tumoral de células tumorales PC-3 humanas xenotransplantadas cultivadas in vivo mediante tratamiento sistémico con oligonucleótidos antisentido

Los ratones Balb/c desnudos atímicos hembra de 6 semanas de edad se adquirieron en M&B, Dinamarca y se dejaron aclimatar durante al menos una semana antes de entrar en los experimentos. Las células cancerosas humanas, normalmente 3×10^6 células suspendidas en 300 µl de matrigel (BD Bioscience), se inyectaron por vía subcutánea en el flanco. Para modelos de xenoinjerto doble se implantan dos tumores, uno en cada flanco. Cuando se estableció crecimiento tumoral, normalmente 5-12 días después de la inyección de células tumorales; se administraron diferentes oligonucleótidos antisentido a 0,01 a 20 mg/kg/día durante hasta 30 días usando la vía de administración IP (intra-peritoneal) bien diariamente, dos veces al día, cada dos o tres días o semanalmente. Los animales control recibieron solución salina sola durante el mismo periodo y mediante la misma vía de administración. Cada grupo experimental incluyó al menos 5 ratones. Las actividades antitumorales se estimaron mediante la inhibición del crecimiento tumoral medida por el volumen del tumor. El crecimiento tumoral se siguió con regularidad midiendo 2 diámetros perpendiculares. Los volúmenes tumorales se calcularon de acuerdo con la fórmula en Teicher BA, Tumour Models in Cancer Research. Humana Press, NJ, USA 2002, pág. 596: Volumen tumoral (mm^3) = $LXW^2 \times 0,5$, en la que L representa el diámetro más largo y W es el diámetro del tumor perpendicular a L. Al final del tratamiento, se sacrificó a los animales y se midieron los pesos tumorales. El volumen tumoral medio y los pesos de los grupos se compararon usando la prueba de Mann-Whitney. Todos los análisis se realizaron en SPSS versión 11.0 para Windows. Véanse las figuras 7A, 7B, 7C y 7D.

Ejemplo 13

Análisis in vivo: Inhibición de Bcl-2 en células tumorales PC-3 humanas xenotransplantadas cultivadas in vivo mediante tratamiento sistémico con oligonucleótidos antisentido

Los ratones Balb/c desnudos atímicos hembra de 6 semanas de edad se adquirieron en M&B, Dinamarca y se dejaron aclimatar durante al menos una semana antes de entrar en los experimentos. Las células cancerosas humanas, normalmente 3×10^6 células suspendidas en 300 µl de matrigel (BD Bioscience), se inyectaron por vía subcutánea en el flanco. Para modelos de xenoinjerto doble se implantan dos tumores, uno en cada flanco. Cuando se estableció crecimiento tumoral, normalmente 5-12 días después de la inyección de células tumorales; se administraron diferentes oligonucleótidos antisentido a 0,01 a 20 mg/kg/día durante hasta 30 días usando la vía de administración IV (intravenosa) o IP (intra-peritoneal) bien diariamente, dos veces al día, cada dos o tres días o semanalmente. Los animales control recibieron solución salina sola durante el mismo periodo y mediante la misma vía de administración. Cada grupo experimental incluyó al menos 5 ratones. Al final del periodo de tratamiento se anestesió a los ratones y se escindieron los tumores e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido.

ES 2 344 566 T3

Para medir si los oligonucleótidos antisentido tienen un efecto inhibitorio sobre los niveles de proteínas se realizó un análisis de transferencia tipo western. Los tumores se homogeneizaron en tampón de lisis (es decir, Tris-CL 20 Mm [Ph 7,5]; 2% de Triton-x-100; 1/100 vol. Conjunto mezcla de inhibidor de proteasa III (Calbiochem); 1/100 vol. del Conjunto mezcla de inhibidor de proteasa II (Calbiochem) a 4°C con el uso de un homogeneizador a motor. Se aplicaron 500 µl de tampón de lisis por 100 mg de tejido tumoral. Los lisados tumorales de cada grupo de ratones se combinaron y centrifugaron a 13.000 g durante 5 min a 4°C para eliminar los residuos tisulares. Las concentraciones proteicas de los extractos tumorales se determinaron usando el kit BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford).

Los extractos proteicos (50-100 µg) se fraccionaron en un gradiente de gel SDS-PAGE que va de 4-20% y se transfirieron a membranas de PVDF y se visualizaron mediante tinción con negroamino. La expresión de Bcl-2 se detectó con anticuerpo frente a Bcl-2 anti-humano sc-509 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, US) o anticuerpo frente a Bcl-2 anti-humano (clon 101, Zymed), seguido por iGg anti-cabra conjugada con peroxidasa de rábano (DAKO). La inmunoreactividad se detectó mediante ECI Plus (Amersham biotech) y se cuantificó mediante un sistema de Versadoc 5000 lite (Bio-Rad).

Ejemplo 14

In vivo: Oligomérico Bcl-2 LNA en comparación con el analizado clínicamente en la actualidad oblimersen sódico (SEC ID N° 56) investigado en ratones SDIC xenotransplantados con melanoma humano 518A2

Ratones hembra C.B-17 scid/scid (SCID) libres de patógenos de 4-6 semanas de edad, en los que se investigó la fuga, se obtuvieron en Harlan & Winkelmann (Borchen, Alemania). Los animales se estabularon en jaulas con microaislante en jaulas de flujo laminar y recibieron alimentos sometidos a autoclave y agua a voluntad. En los ratones SCID se inyectó por vía subcutánea (s.c) en el flanco inferior izquierdo 1,5 x 10⁷ células de melanoma humano 518A2 resuspendidas en 200 µl de PBS. Tras 10 días, todos los ratones desarrollaron tumores s.c. palpables, se aleatorizaron a grupos de tratamiento o control y se inició el tratamiento. Para la administración s.c. continua se anestesió a los ratones y, vía subcutánea, se implantaron bombas miniosmóticas (Alzet 2002, Alza, Mountain View, CA, EE.UU.) cargadas con oligonucleótidos en solución salina o solución salina como vehículo control en un saco paraespinal.

Actividad antitumoral. SEC ID N° 56 (referencia) se administró mediante bombas miniosmóticas s.c. durante 14 días a la dosis estándar de 7 mg/kg/día como programa de referencia. El compuesto oligomérico LNA de SEC ID N° 15 se administró a 7, 3,5 y 1,75 mg/kg mediante infusión s.c. continua durante 14 días. Los animales tratados con solución salina se usaron como control.

El crecimiento del tumor en el tiempo mediante medición con compás y el peso tumoral en el momento de la finalización de los experimentos fueron los principales parámetros a determinar.

Véanse las figuras 8A, 8B, 9, 10A, 10B y 10C que muestran los datos de la SEC ID N° 15 s 1,75 mg/kg. Concentraciones crecientes (7 y 3,5 mg/kg) no produjeron una disminución adicional del peso del tumor o del volumen del tumor, lo que indica que el compuesto de la SEC ID N° 15 tiene una curva de respuesta a la dosis a concentraciones menores.

La figura 11 muestra datos sobre la SEC ID N° 8 a 1 y 7 mg/kg y los datos de la SEC ID N° 15 y la SEC ID N°: 56 a 7 mg/kg. No se observaron pérdidas del peso corporal durante el periodo de tratamiento cuando se administró el compuesto de SEC ID N° 8 y los controles mostraron un patrón similar.

Ejemplo 15

Estabilidad de la SEC ID N° 15 y la SEC ID N°: 8 en plasma de rata

La estabilidad de la SEC ID N° 15 20 µM en plasma de rata (machos NtacSD, Li-Heparina (Taconic, M&B)) a 37°C a alícuotas a tiempos diferentes: 0, 4, 24 y 48 h. La SEC ID N° 56 corresponde a la SEC ID N° 56 (referencia). Las SEQ ID N°: 20 y 16 son otros oligonucleótidos que también se analizaron. Los oligonucleótidos correspondientes a n-1, n-2 y n-3 de la SEC ID N° 15 (desde el extremo 3') se incluyeron con el fin de tener un control que permitiría la identificación de posibles fragmentos de digestión de la SEC ID N° 15. También se incluyó una escalera disponible comercialmente (10 y 20 mer son visibles en el PAGE). (Véase la figura 12A)

La estabilidad de la SEC ID N° 8 20 µM en plasma de rata (machos NtacSD, Li-Heparina (Taconic, M&B)) a 37°C a alícuotas a tiempos diferentes: 0, 4, 24 y 48 h. La SEC ID N° 56 corresponde a la SEC ID N° 56 (referencia). SEC ID N° 9 es otro oligonucleótido que también se analizó. Los oligonucleótidos correspondientes a n-1, n-2 y n-3 de la SEC ID N° 8 (desde el extremo 3') se incluyeron con el fin de tener un control que permitiría la identificación de posibles fragmentos de digestión de la SEC ID N° 8. También se incluyó una escalera disponible comercialmente (10 y 20 mer son visibles en el PAGE). (Véase la figura 12B)

Los compuestos oligoméricos, por ejemplo de SEC ID N° 8 y la SEC ID N°: 15 se sintetizaron como oligonucleótidos con ADN en la posición 3' unidos por un enlace fosforotioato al LNA adyacente. Este resto de ADN 3' se

ES 2 344 566 T3

puede escindir mediante exonucleasas. El producto de degradación es un compuesto oligomérico acortado en 1 nucleótido (N1) (SEC ID N° 35) que tiene una resistencia sustancialmente incrementada a la degradación por nucleasas en comparación con la molécula parental de longitud completa. Los compuestos N1 (por ejemplo de SEC ID N° 35) conservan toda la actividad en el caso de, por ejemplo, la SEC ID N° 8 (véase la Figura 2C).

5

Ejemplo 16

Análisis de la semivida tisular de la SEC ID N° 15 en hígado y riñón

10

90 ratones NMRI hembra (aprox. 30 g) se dividieron en grupos de 5 y se les administró 25 mg/kg de SPS 2996 i.v. (10 ml/kg, 2,5 mg/ml) durante 30 segundos. El grupo control recibió solución salina al 0,9%. Después, se recogieron los grupos a los 30 minutos, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas de la inyección. Se tomaron muestras de tejido y se prepararon en ARN más tarde.

15

Extracción de oligonucleótidos del tejido

20

Aproximadamente 100 mg de tejido se homogeneizaron mecánicamente en 500 μ l de tampón de extracción (0,5% de Igepal CA-630, Tris 25 mM a pH 8,0, EDTA 25 mM, NaCl 100 mM que contiene 1 mg/ml de ARNasa A) y se incubaron durante la noche a 37°C. 500 ml se contaminaron con oligonucleótido de referencia y se extrajeron mediante la adición de 1 ml de fenol-isoamil-cloroformo (25:1:24 (v/v/v)). La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se extrajo de nuevo. En caso necesario se liofilizó el extracto.

25

Análisis IEX-HPLC de oligonucleótido extraído de muestras tisulares

30

Un volumen de la muestra de 50 μ l se separó sobre una columna DNAPac PA-100 (2x250 mm, Dionex) equipada con una columna de guardia DNAPac PA-100 (2x50 mm, Dionex). Las columnas se calentaron hasta 40°C. El caudal fue de 0,25 ml/min y la longitud de onda para la detección 260 nm. Un gradiente de las fases móviles A: TRIS (20 mM), EDTA (1 mM) y perclorato sódico (10 mM) pH 7,6. B: TRIS (20 mM), EDTA (1 mM) y perclorato sódico (1 mM) pH 7,6, (0-13 min., A: 20%, B: 20%; 14-18 min., A: 40%, B: 60%; 22-28 min., A 0%, B: 100%; 33-38 min., A: 80%, B: 20%).

35

La figura 13 muestra la semivida tisular de la SEC ID N° 15 en hígado y riñón de ratones NMRI tras una única dosis administrada i.v. (25 mg/kg),

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto oligomérico constituido por la secuencia C_sT_sc_sc_sc_sa_sa_sc_sg_st_sg_sc_sg_sC_sC_sa (SEC ID N° 15), en la que las letras en mayúscula designan los nucleótidos LNA, las letras minúsculas designan los nucleótidos de ADN, el subíndice “s” designa que los nucleótidos adyacentes están unidos por un grupo fosforotioato y en la que todos los monómeros LNA-C son metil-C.
- 10 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los nucleótidos LNA son nucleótidos beta-D-oxi-LNA.
3. Un conjugado que comprende el compuesto oligomérico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y al menos un resto no nucleotídico/no polinucleotídico unido covalentemente a dicho compuesto.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto oligomérico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3 y un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende otro agente seleccionado del grupo constituido por compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivirales, compuestos citostáticos, compuestos antiangiogénicos, compuestos antiproliferativos, compuestos proapoptóticos, moduladores de la transducción de la señal e inhibidores de la quinasa.
- 25 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el agente adicional comprende al menos un compuesto quimioterapéutico, tal como fludarabina o taxano.
- 30 7. Un compuesto oligomérico de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso como medicamento.
8. El compuesto oligomérico de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad cancerosa.
- 35 9. El compuesto oligomérico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la enfermedad cancerosa se selecciona del grupo constituido por leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma folicular y linfoma difuso de células B grandes.
- 40 10. Uso del compuesto oligomérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cancerosa.
- 45 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad cancerosa se selecciona del grupo constituido por leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma folicular y linfoma difuso de células B grandes.
- 50 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que dicho tratamiento se combina con la administración de un agente adicional seleccionado del grupo constituido por compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivirales, compuestos citostáticos, compuestos antiangiogénicos, compuestos antiproliferativos, compuestos proapoptóticos, moduladores de la transducción de la señal e inhibidores de la quinasa.
- 55 13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que dicho medicamento se usa en combinación con al menos un compuesto quimioterapéutico, tal como fludarabina o taxano.
14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que dicho medicamento se usa junto, o secuencialmente, con uno o más compuestos anticuerpos.
- 60 15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en el que dicho compuesto oligomérico o agente adicional se usa en combinación con radioterapia.
- 65 16. Un procedimiento *in vitro* para inducir apoptosis celular, en el que dicho procedimiento comprende poner en contacto la célula con un compuesto oligomérico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, por lo que se induce la apoptosis celular.
17. Un procedimiento *in vitro* para prevenir o reducir la proliferación celular, en el que dicho procedimiento comprende poner en contacto la célula con un compuesto oligomérico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 3 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, por lo que se previene o reduce la proliferación celular.

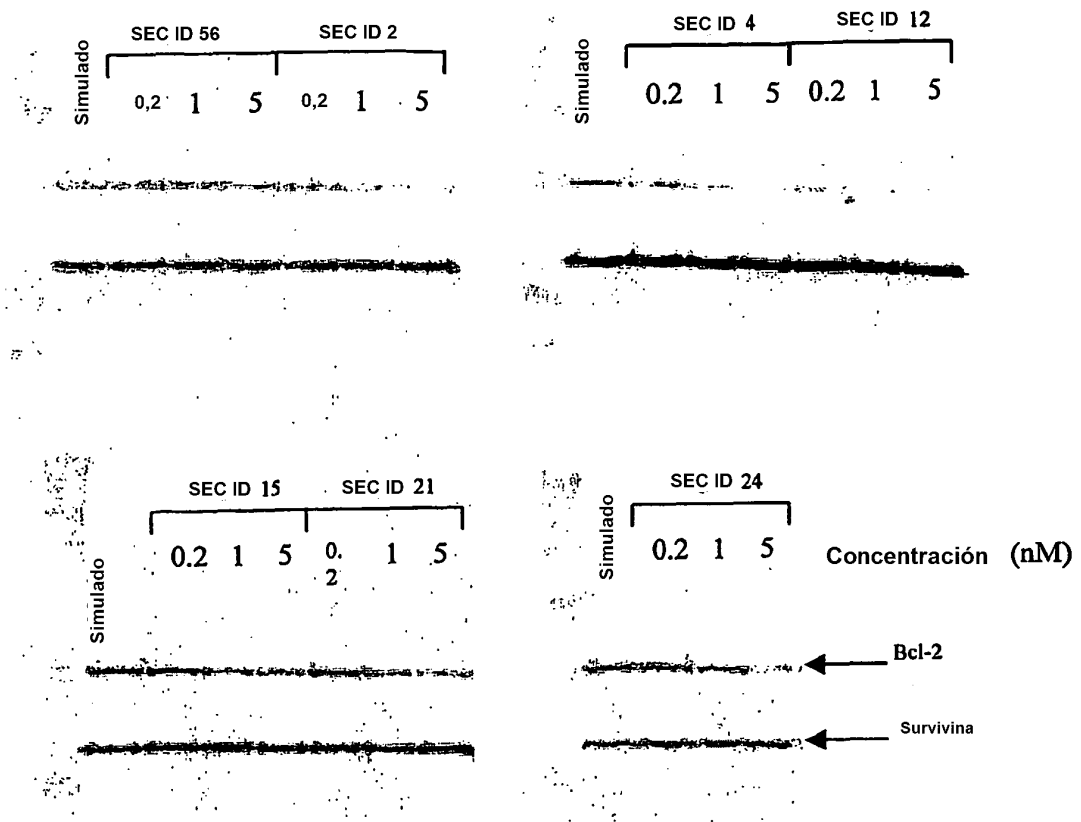


Figura 1

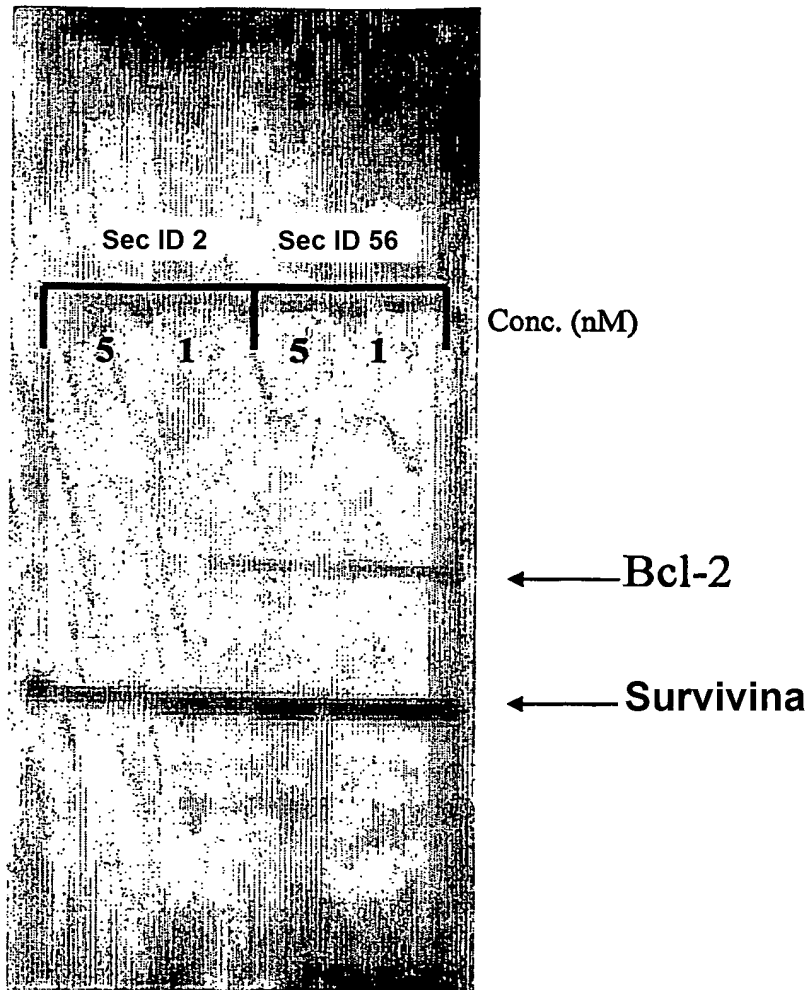
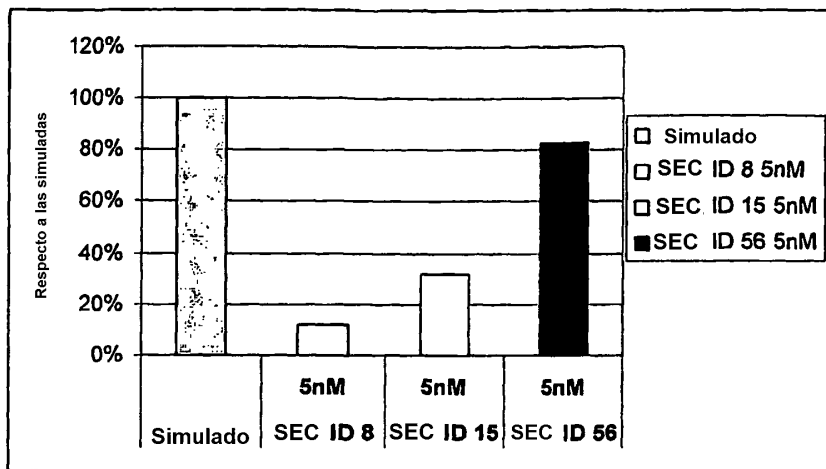


Figura 2A



Mock
SEQ ID 8
SEQ ID 15
SEQ ID 56

Tublina
Bcl-2

Figura 2B

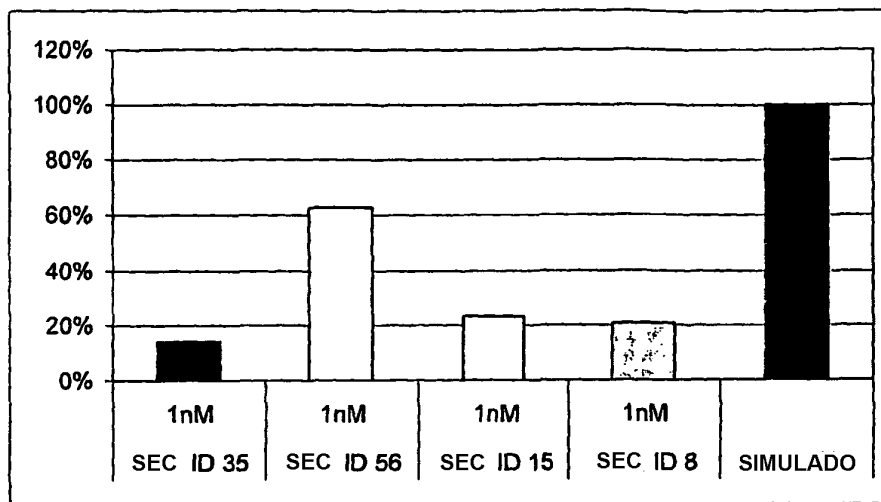


Figura 2C

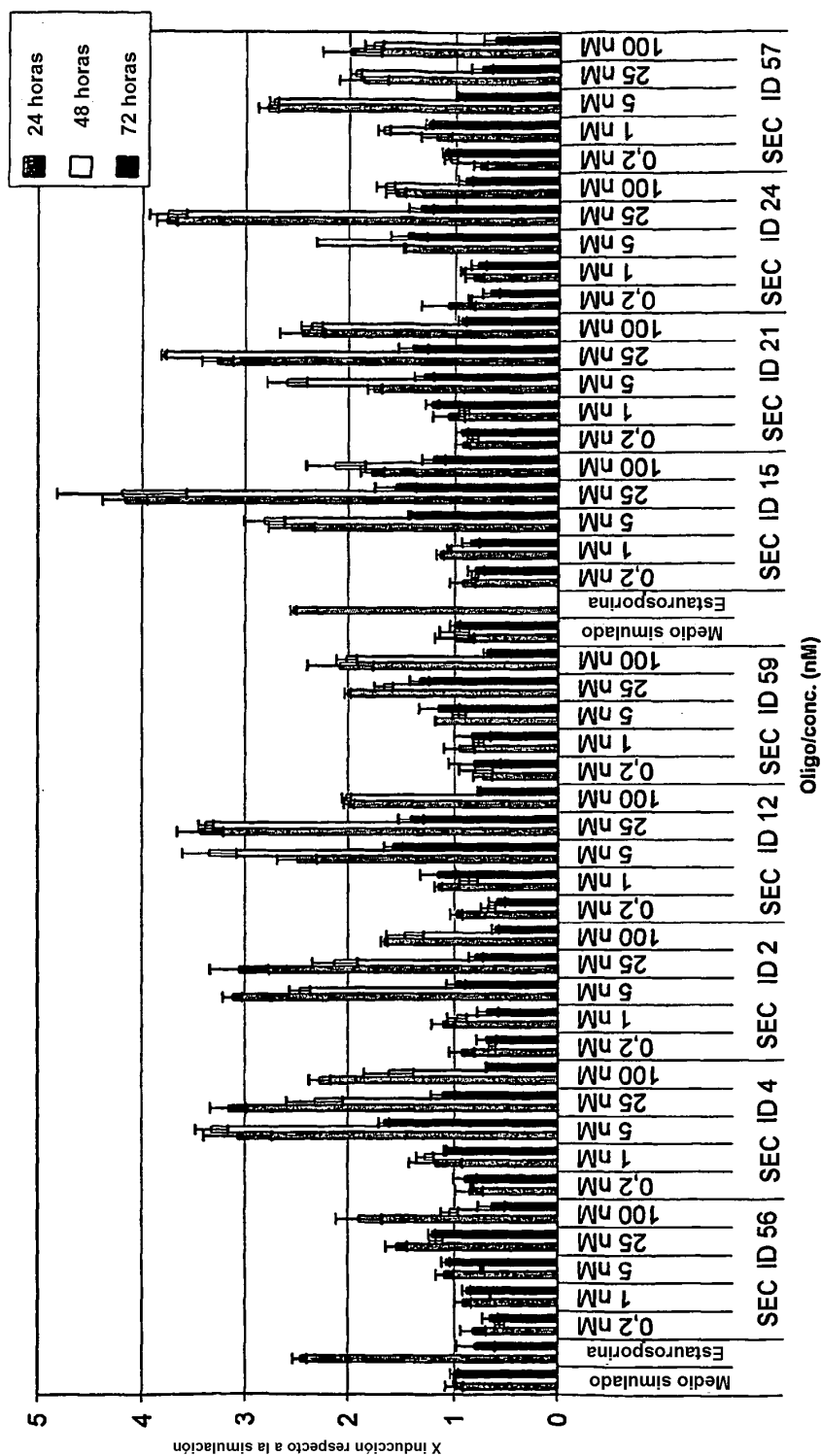


Figura 3A

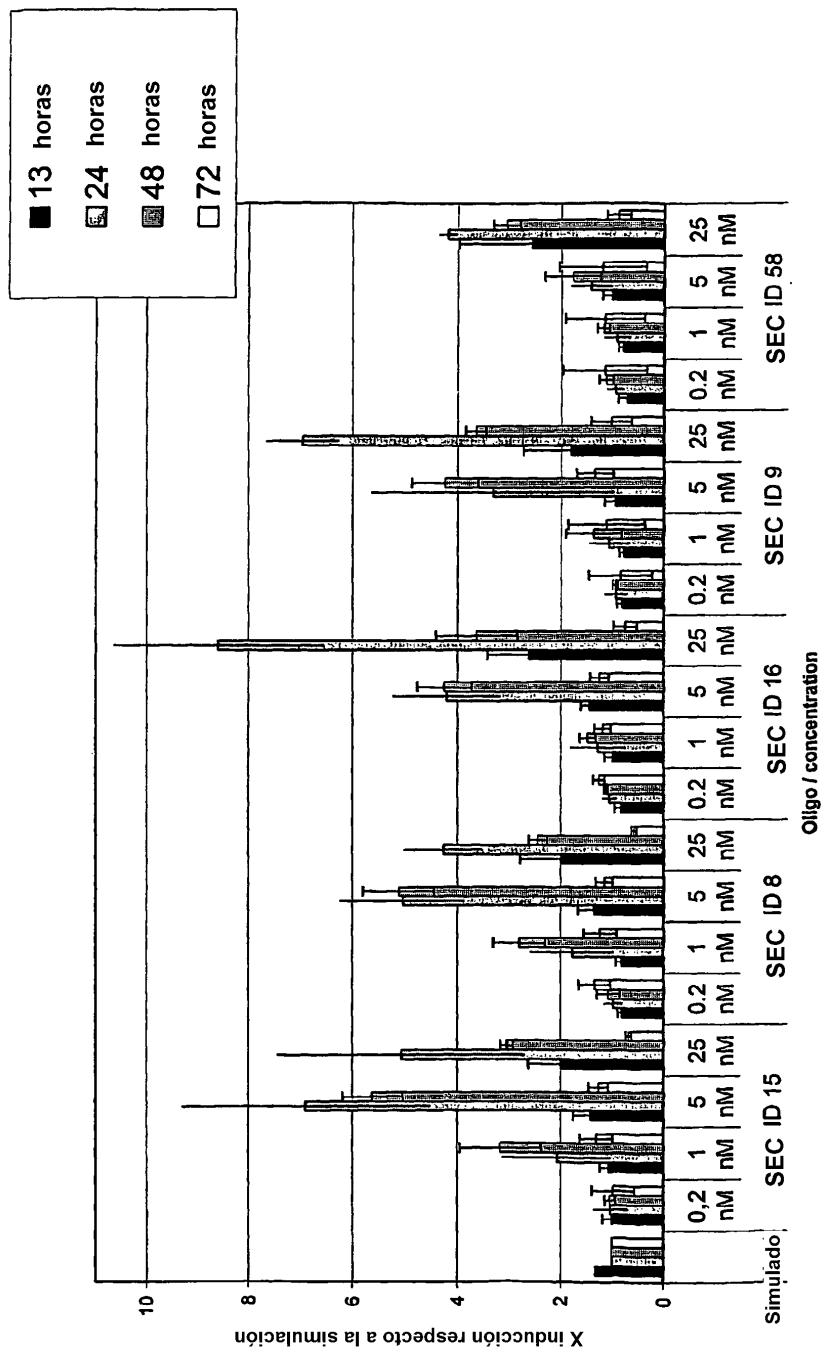


Figura 3B

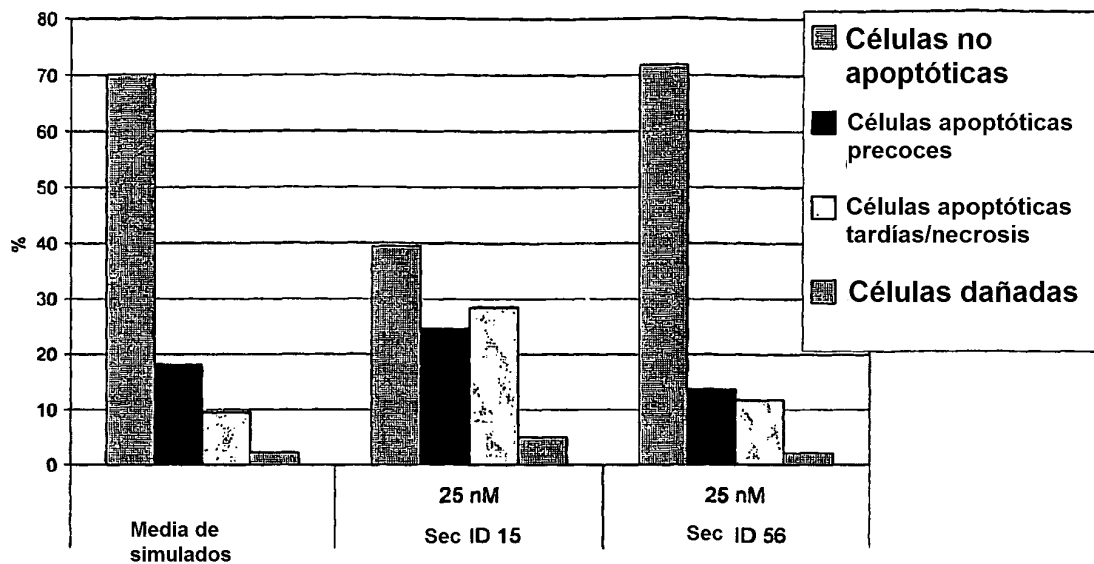


Figura 3C

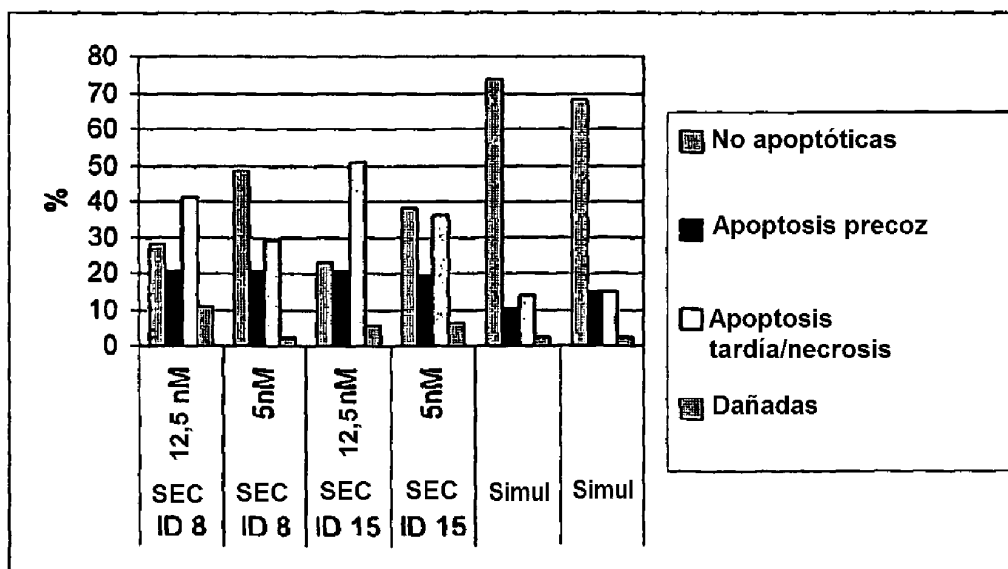


Figura 3D

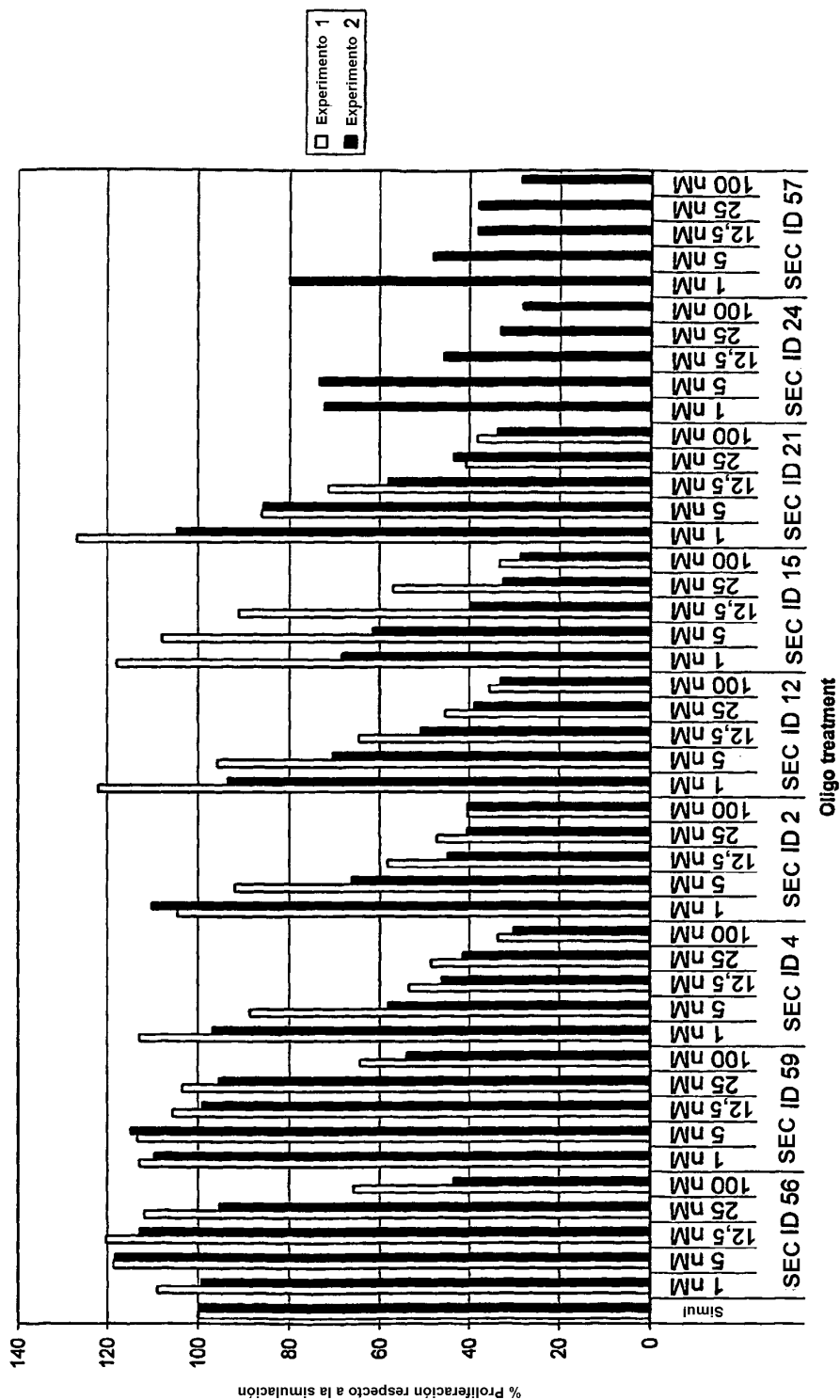


Figura 4

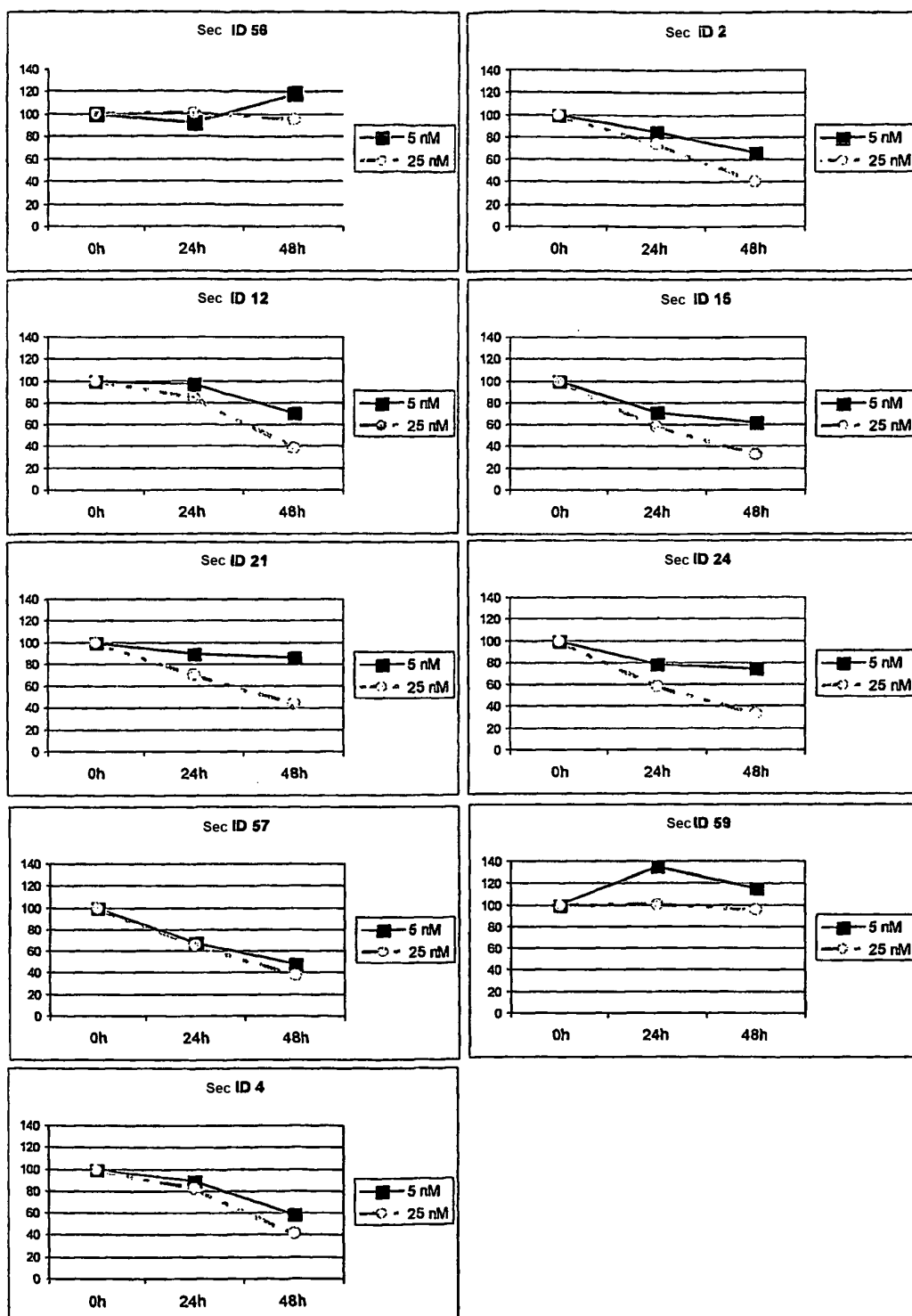


Figura 5

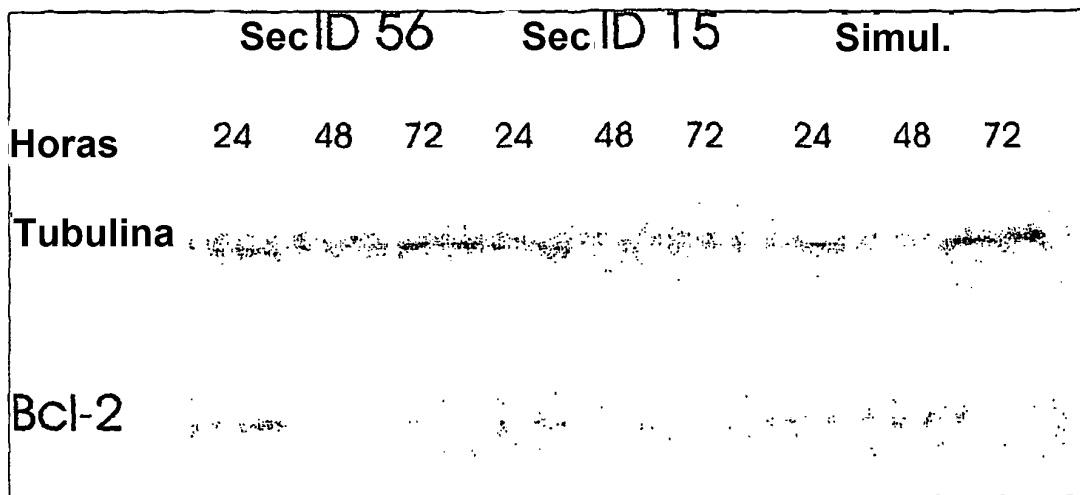


Figura 6

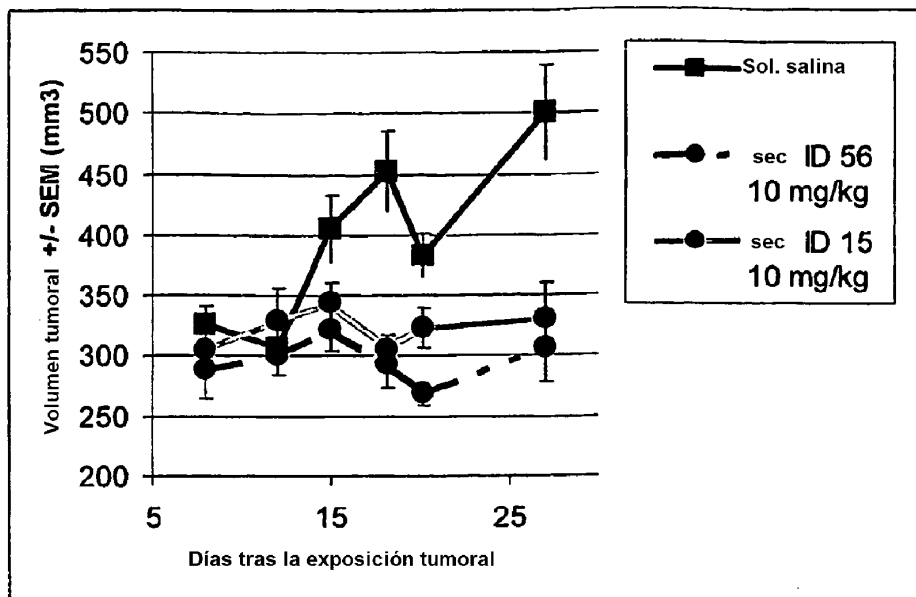


Figura 7A

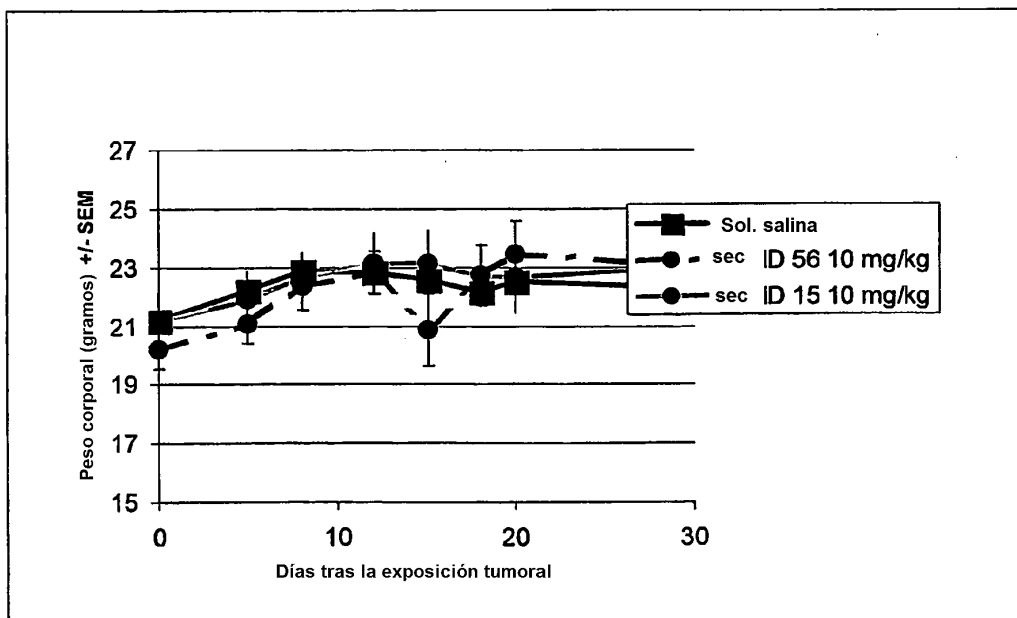


Figura 7B

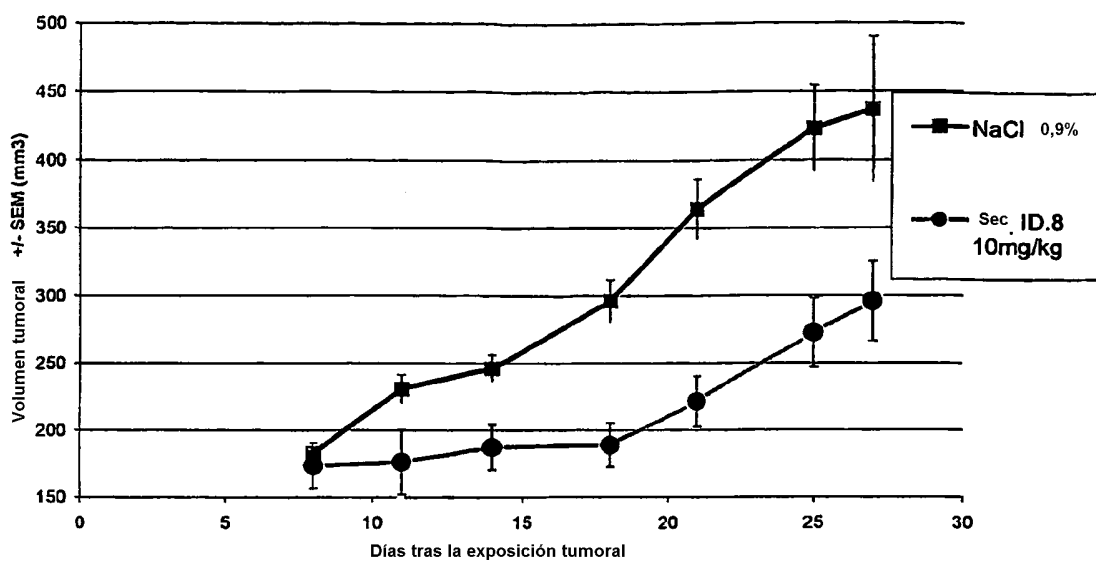


Figura 7C

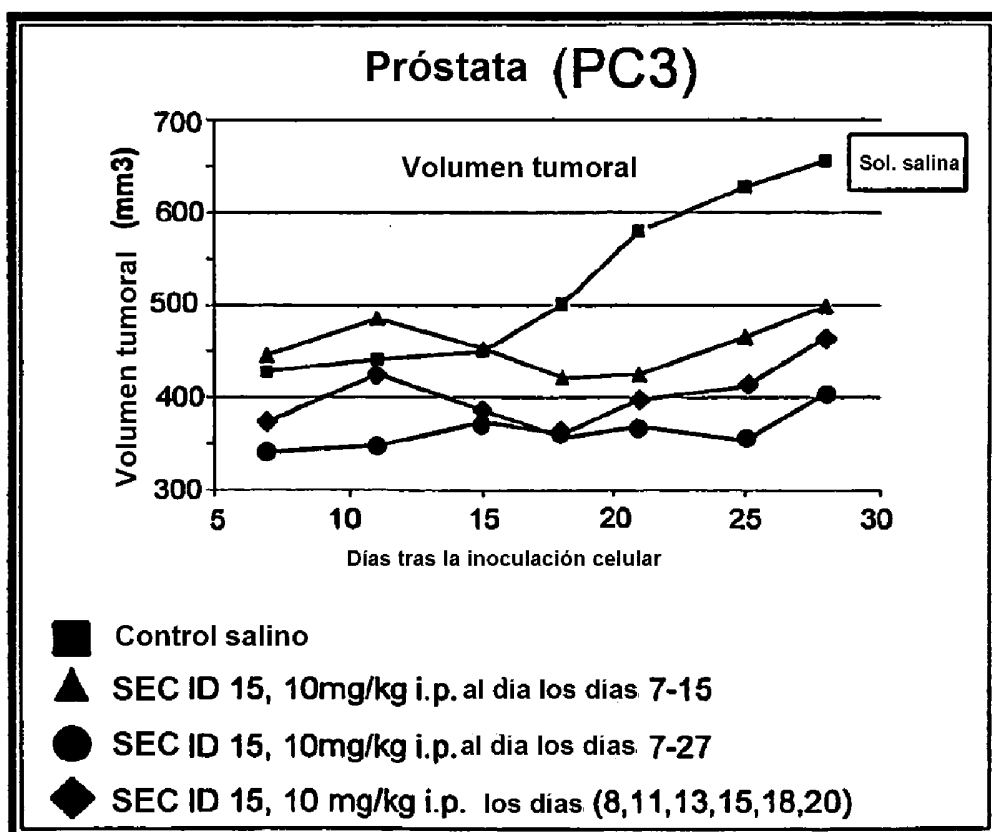


Figura 7D

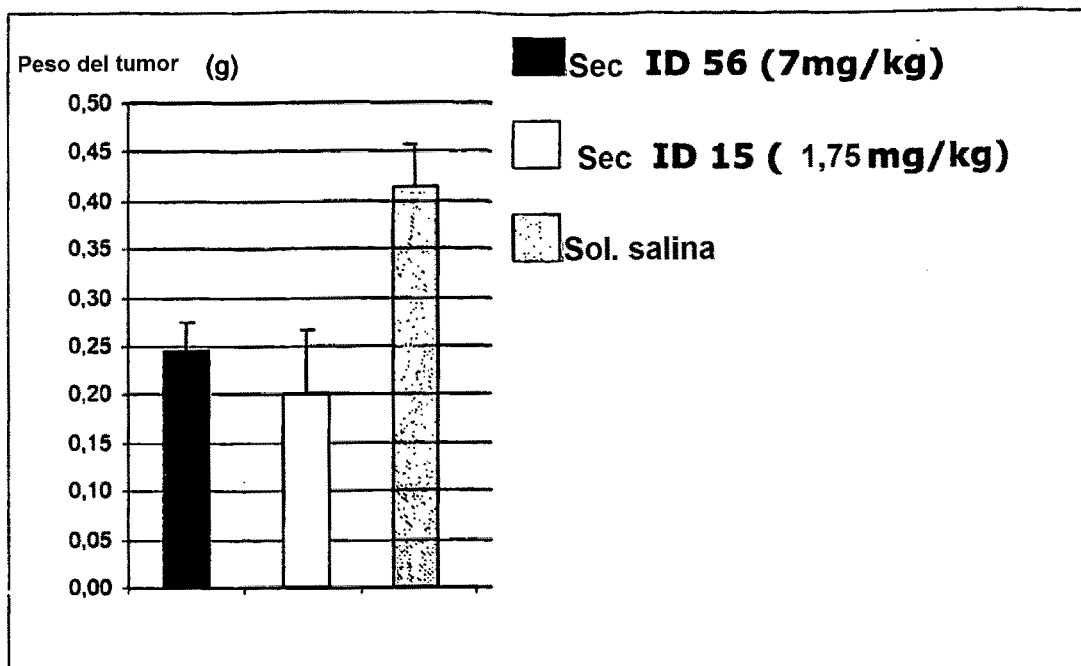


Figura 8A

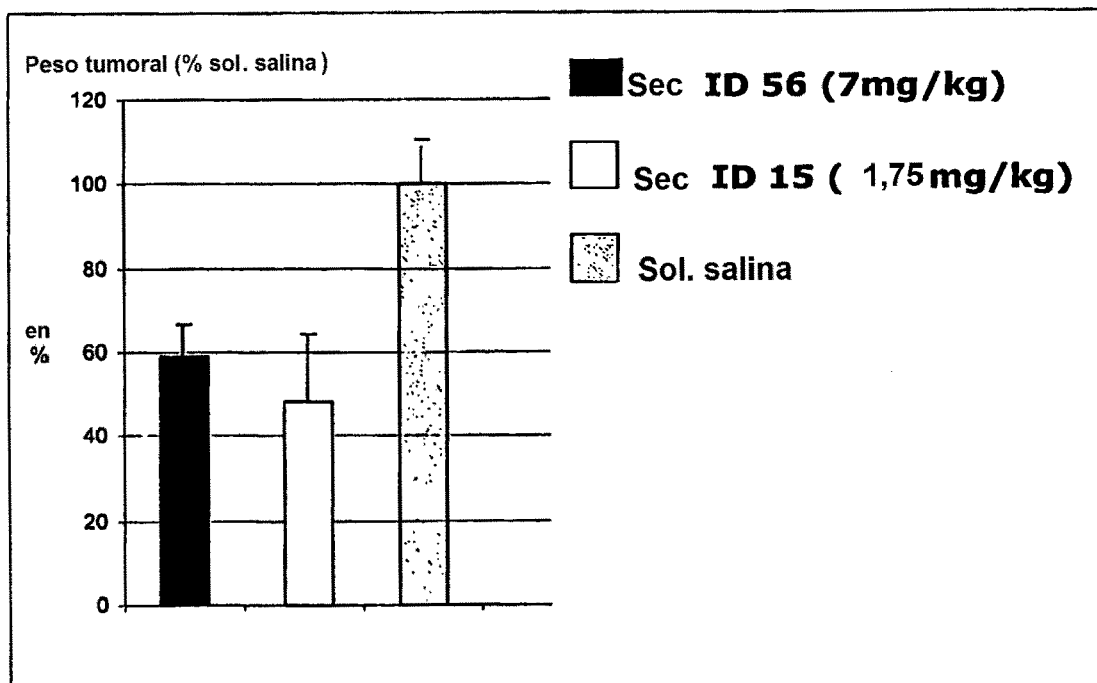


Figura 8B

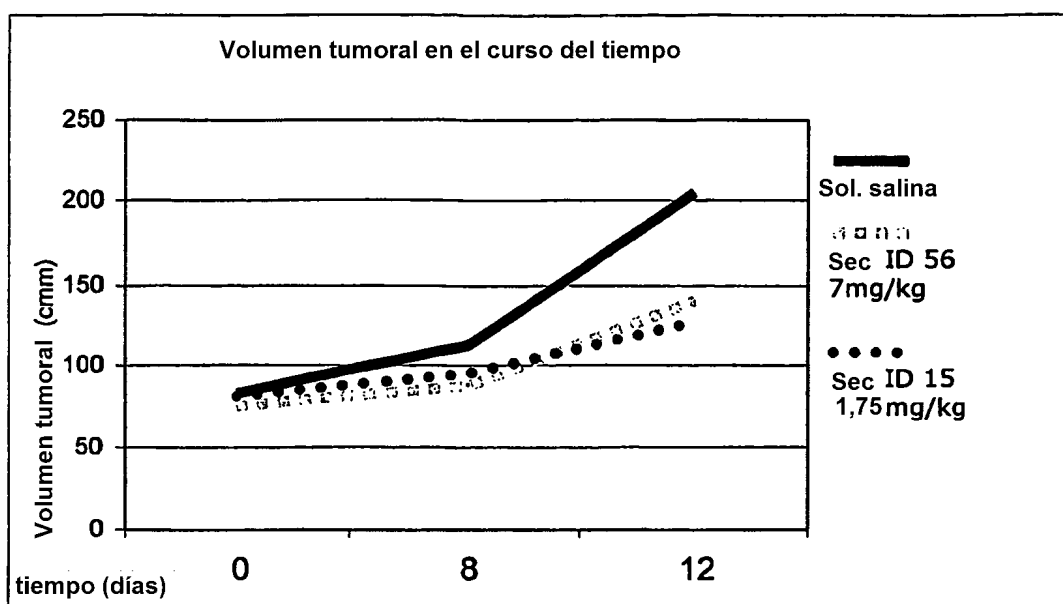


Figura 9

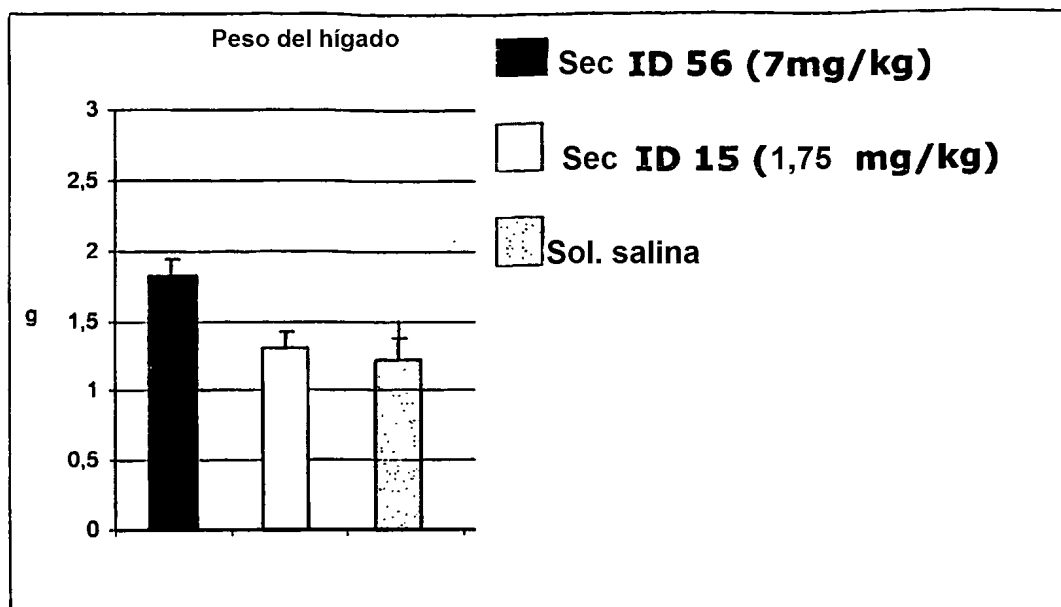


Figura 10A

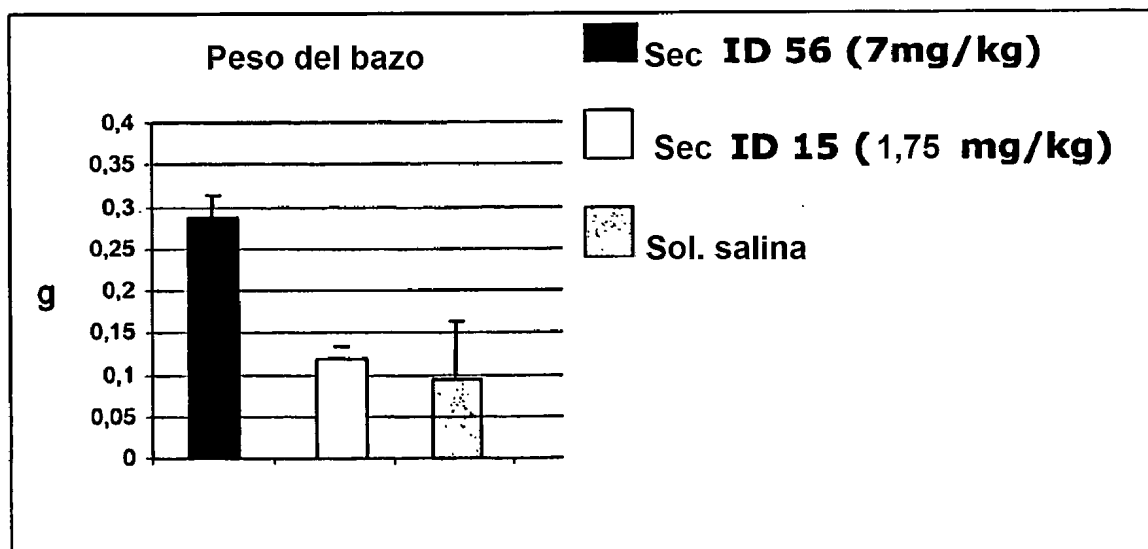


Figura 10B

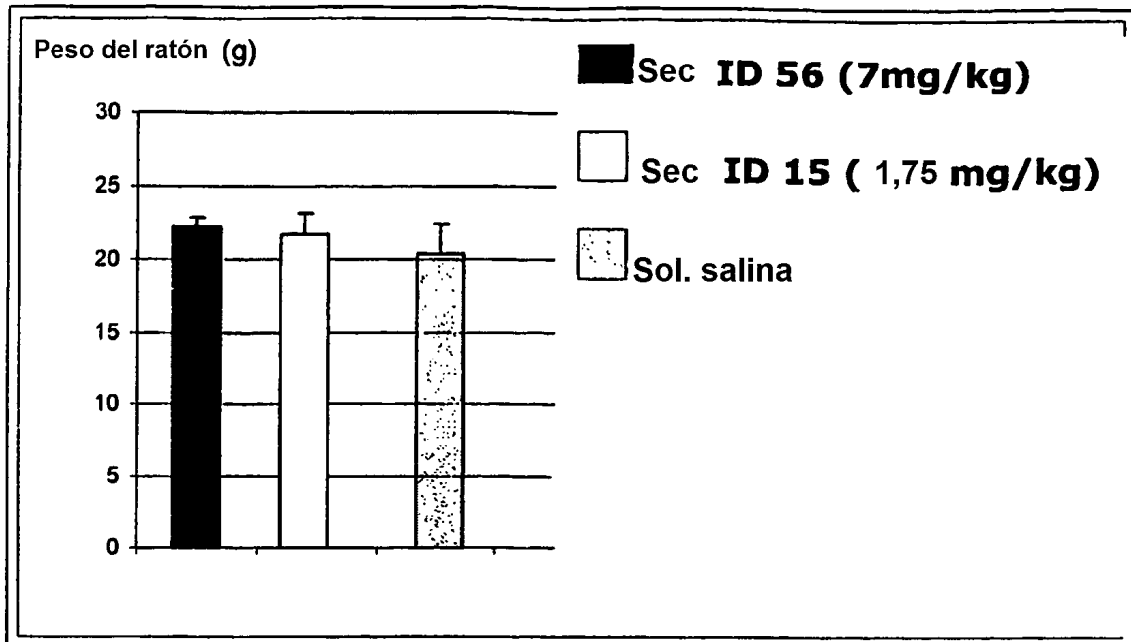


Figura 10C

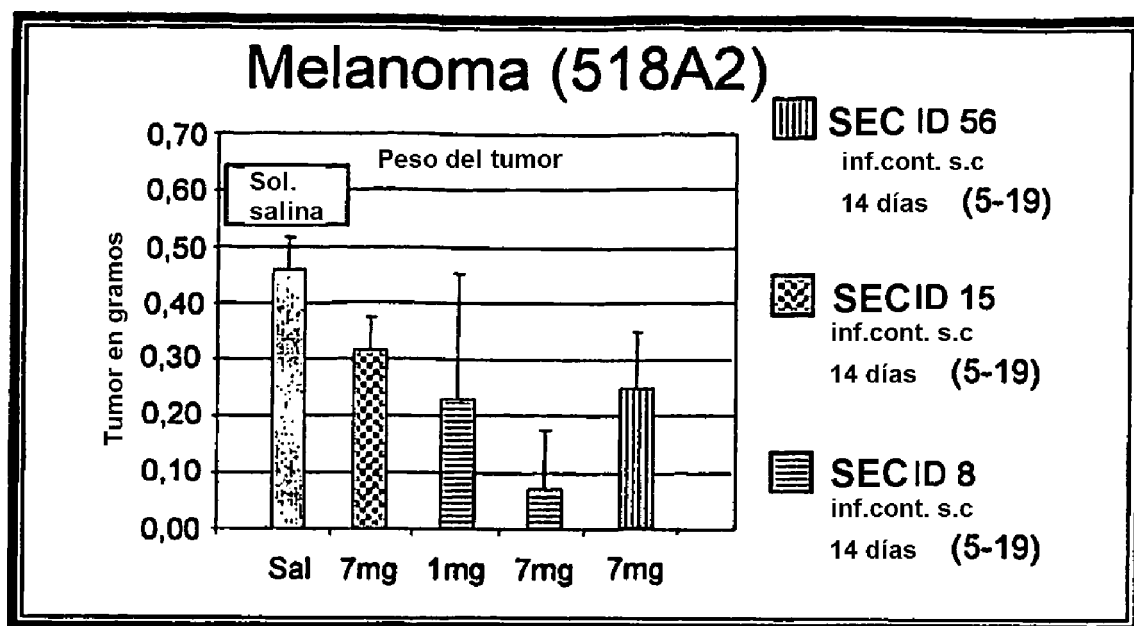


Figura 11

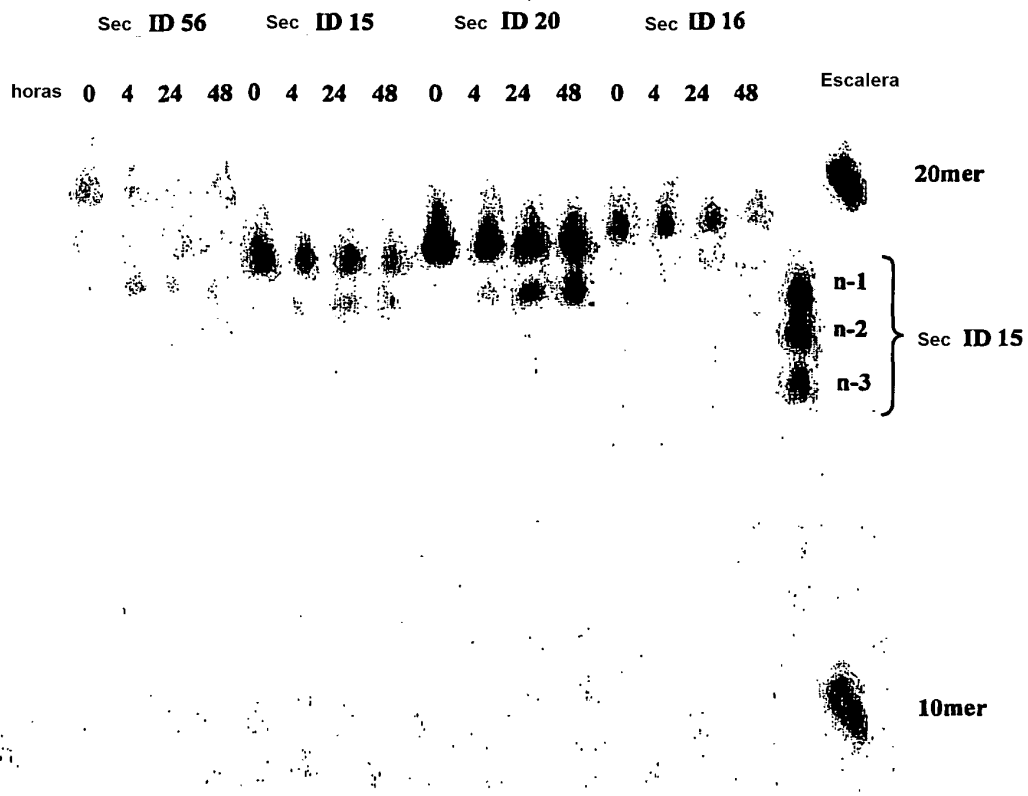


Figura 12A

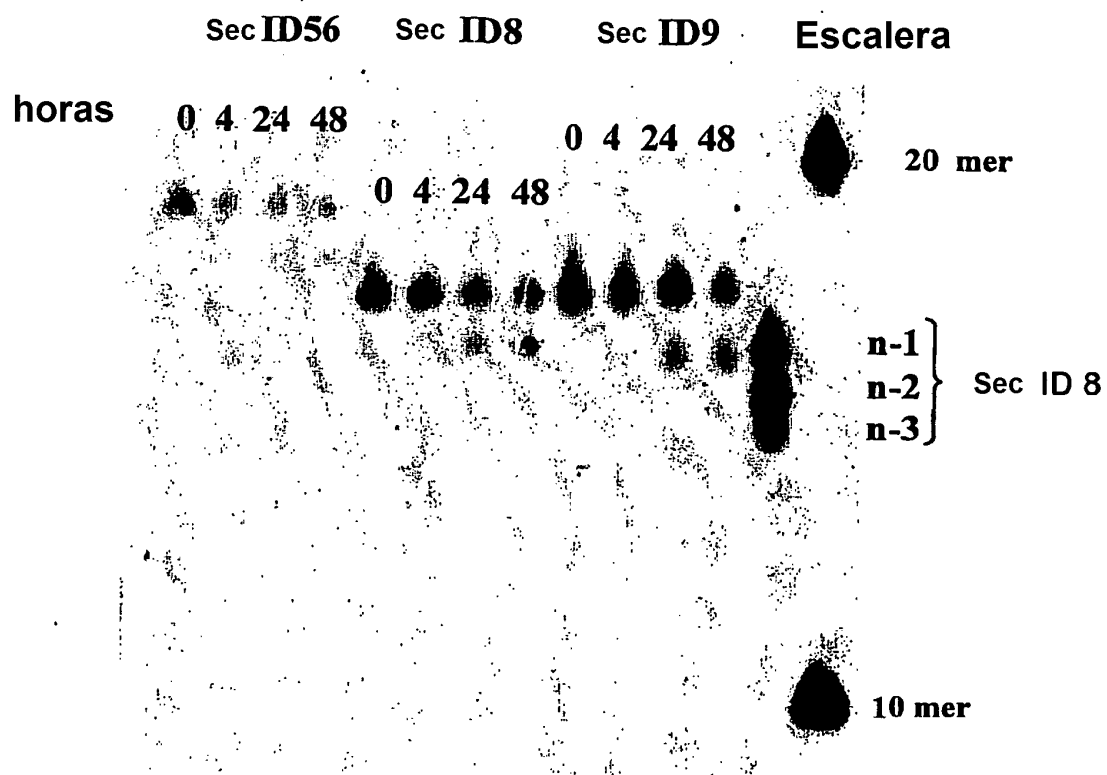


Figura 12B

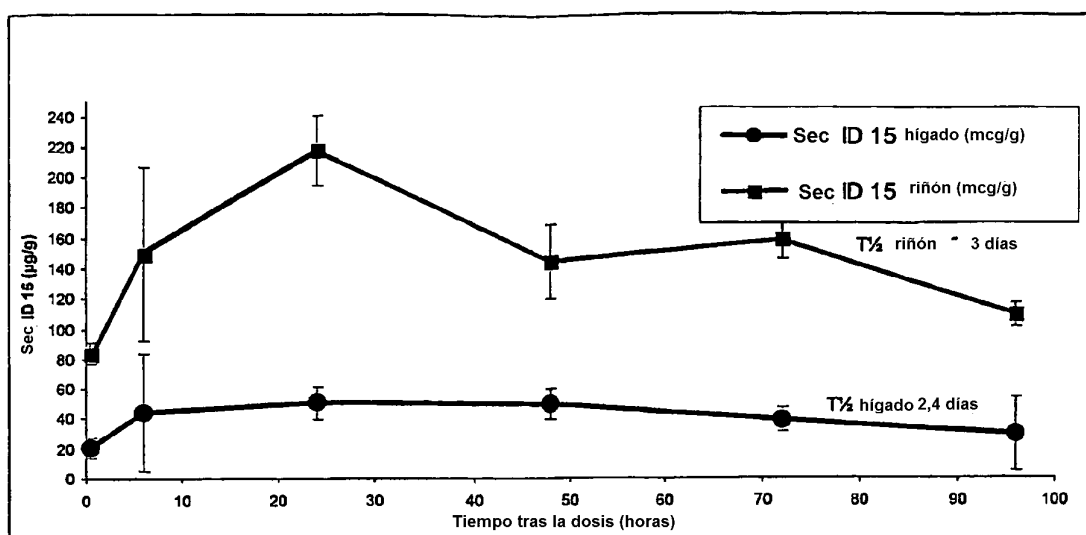


Figura 13

ES 2 344 566 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Santaris Pharma A/S

5 <120> Compuestos oligoméricos para la modulación de bcl-2

<130> 15705PCT00

10 <160> 64

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n es 5-metil citosina

35 <400> 1

40 tntcccagcg tgcgcnat

<210> 2

45 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

55 <221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(16)
<223> n es 5-metil citosina

65

ES 2 344 566 T3

<400> 2
tntcccagcg tgcggnat 18

5
<210> 3
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

15
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
20 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (4)..(4)
<223> n es 5-metil citosina

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (15)..(16)
<223> n es 5-metil citosina

35
<400> 3
tntnccagcg tgcggnat 18

40
<210> 4
<211> 18
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
55 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
60 <222> (4)..(4)
<223> n es 5-metil citosina

<220>
65 <221> misc_feature
<222> (15)..(16)

ES 2 344 566 T3

<223> n es 5-metil citosina

<400> 4

5

tntnccagcg tgcggnat

18

<210> 5

10

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n es 5-metil citosina

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(16)

30

<223> n es 5-metil citosina

<400> 5

35

tntcccagcg tgcggnat

18

<210> 6

<211> 18

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

<221> misc_feature

50

<222> (2)..(2)

<223> n es 5-metil citosina

<220>

55

<221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> n es 5-metil citosina

60

<400> 6

tntcccagcg tgcggnat

18

65

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

ES 2 344 566 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética
<220>
<221> misc_feature
10 <222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina
<220>
15 <221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n es 5-metil citosina
20 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(16)
25 <223> n es 5-metil citosina
<400> 7
30 tntnccagcg tgcggnat
<210> 8
<211> 16
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética
<220>
<221> misc_feature
45 <222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina
<220>
50 <221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina
55 <400> 8
ntcccagcgt gcggna
60 <210> 9
<211> 16
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial
<220>

18

16

ES 2 344 566 T3

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n es 5-metil citosina

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n es 5-metil citosina

15

<400> 9

ntcccagcgt gcgna

16

20

<210> 10

<211> 16

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (1)..(1)

<223> n es 5-metil citosina

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> n es 5-metil citosina

45

<400> 10

ntcccagcgt gcgna

16

50

<210> 11

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

60

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n es 5-metil citosina

65

<220>

ES 2 344 566 T3

<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es 5-metil citosina
5
<400> 11

ntcccagcgt gcgna 16
10
<210> 12
<211> 16
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
20
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
25 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (3)..(3)
<223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina
40
<400> 12

ntnccagcgt gcgna 16
45
<210> 13
<211> 16
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
55
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
60 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
65 <222> (3)..(4)
<223> n es 5-metil citosina

ES 2 344 566 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
5 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

<400> 13
15
 ntnncagcgtgngna 16

<210> 14
20 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> a es 5-metil citosina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
40 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

<400> 14
50
 ntnccagcgt gcgna 16

<210> 15
55 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)

ES 2 344 566 T3

<223> n es 5-metil citosina

<220>

5 <221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

10 <400> 15

ntcccaacgt gcgna 16

15 <210> 16
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

35 <400> 16

40 ntcccaacgt gcgna 16

<210> 17

45 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

55 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n es 5-metil citosina

65 <220>

ES 2 344 566 T3

<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina
5
<400> 17

 ntccaacgt gcgna
10
<210> 18
<211> 16
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
20
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
25 <223> n es 5-metil citosina

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n es 5-metil citosina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina
40
<400> 18

 ntccatcgt gcgna
45
<210> 19
<211> 16
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
55
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
60 <223> n es 5-metil citosina

<220>
65 <221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> n es 5-metil citosina

ES 2 344 566 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
5 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

<400> 19
15
 ntnncaacgtgngna 16

<210> 20
20 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
40 <223> n es 5-metil citosina

<400> 20
45
 ntcccaacgt gcgna 16

<210> 21
<211> 16
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
<221> misc_feature
60 <222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)

ES 2 344 566 T3

<223> n es 5-metil citosina

<400> 21

5 ntcccagcgt gcgna 16

<210> 22

10 <211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n es 5-metil citosina

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

30 <223> n es 5-metil citosina

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (14)..(15)

<223> n es 5-metil citosina

<400> 22

40 ntncagcgc gcgna 16

<210> 23

45 <211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

55 <221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n es 5-metil citosina

60 <220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(4)

65 <223> n es 5-metil citosina

<220>

ES 2 344 566 T3

<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es 5-metil citosina
5
<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
10 <223> n es 5-metil citosina

<400> 23

15 ntnncagcgc gngna 16

<210> 24
<211> 16
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina
40
<400> 24

 ntcccagcga gcgna 16
45
<210> 25
<211> 16
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
55
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
60 <223> n es 5-metil citosina

<220>
65 <221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

ES 2 344 566 T3

<400> 25

ntcccagcgg gcgna

16

5

<210> 26

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

20

<223> n es 5-metil citosina

<220>

<221> misc_feature

25

<222> (15)..(16)

<223> n es 5-metil citosina

30

<400> 26

tntcccagag tgcggnat

18

35

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

45

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n es 5-metil citosina

50

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(16)

55

<223> n es 5-metil citosina

<400> 27

60

tntcccagtg tgcggnat

18

<210> 28

<211> 18

65

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 344 566 T3

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(16)
<223> n es 5-metil citosina

15 <400> 28

20 tntcccaggg tgcggnat 18

<210> 29
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

40 <400> 29

45 ntccaacgt gcggn 15

50 <210> 30
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

65

ES 2 344 566 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
5 <223> n es 5-metil citosina

<400> 30

10 ntccaacgt gcgn 14

<210> 31
<211> 13
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

<400> 31
30 ntccaacgt gcg 13

<210> 32
35 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> n es 5-metil citosina

50 <400> 32

tccaacgtg cgna 15

55 <210> 33
<211> 14
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
65 <220>
<221> misc_feature

ES 2 344 566 T3

<222> (12)..(13)
<223> n es 5-metil citosina

5 <400> 33
cccaacgtgc gna 14

10 <210> 34
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> n es 5-metil citosina

25 <400> 34
ccaacgtgcg nna 13

30 <210> 35
<211> 15
<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

50 <400> 35
ntccacgct gcggn 15

60 <210> 36
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

ES 2 344 566 T3

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> n es 5-metil citosina

10
<400> 39

cccagcgtgc gna 14

15
<210> 40
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> n es 5-metil citosina

30
<400> 40

ccagcgtgcg nna 13

35
<210> 41
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

55
<400> 41

ntcccagcgt gcgenat 17

60
<210> 42
<211> 17

65

ES 2 344 566 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
20 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

<400> 42
30 ntncacgct gcggnat

<210> 43
35 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es 5-metil citosina

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
55 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
60 <222> (14)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

<400> 43
65 ntncacgct gcggnat

17

17

ES 2 344 566 T3

<210> 44
<211> 17
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
10

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
15 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (15)..(16)
<223> n es 5-metil citosina

25 <400> 44
tntcccagcg tgcgna 17

<210> 45
30 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(16)
50 <223> n es 5-metil citosina

<400> 45
55 tntcccagcg tgcgna 17

<210> 46
<211> 17
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética

ES 2 344 566 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
5 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (4)..(4)
<223> n es 5-metil citosina

<220>
15 <221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n es 5-metil citosina

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(16)
25 <223> n es 5-metil citosina

<400> 46
30 tntnccagcg tgngnna

17

<210> 47
<211> 16
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

<220>
50 <221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

55 <400> 47

tntcccagcg tgcgnc

16

60 <210> 48
<211> 16
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 344 566 T3

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

5 <221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n es 5-metil citosina

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

20 <400> 48

25 tntcccagcg tngnc

<210> 49

30 <211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

40 <221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n es 5-metil citosina

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n es 5-metil citosina

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n es 5-metil citosina

60 <400> 49

65 tntnccagcg tngnc

16

16

ES 2 344 566 T3

<210> 50
<211> 16
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
10

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
15 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (14)..(14)
<223> n es 5-metil citosina

25 <400> 50
tncacgctg cgcnat

30 <210> 51
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> n es 5-metil citosina

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
50 <223> n es 5-metil citosina

<400> 51
55 tncacgctg cgnnat

<210> 52
<211> 16
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética

16

16

ES 2 344 566 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(4)
5 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (13)..(14)
<223> n es 5-metil citosina

<400> 52
15
 tnnnagcgtg cggnat 16

<210> 53
20 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(16)
40 <223> n es 5-metil citosina

<400> 53
45 tntcccagca tgcgnat 18

<210> 54
<211> 18
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
<221> misc_feature
60 <222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

<220>
65 <221> misc_feature
<222> (15)..(16)

ES 2 344 566 T3

<223> n es 5-metil citosina

<400> 54

5

tntcccagct tgcggnat

18

<210> 55

10

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n es 5-metil citosina

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(16)

30

<223> n es 5-metil citosina

<400> 55

35

tntcccagcc tgcggnat

18

<210> 56

<211> 18

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<400> 56

50

tctcccagcg tgcgccat

18

<210> 57

<211> 18

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

65

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n es 5-metil citosina

ES 2 344 566 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(16)
5 <223> n es 5-metil citosina

<400> 57

10 tntcccagca tgtggnat 18

<210> 58
<211> 16
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (2)..(2)
<223> n es 5-metil citosina

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n es 5-metil citosina
35 <400> 58

ancgcgtgcg accntc 16
40
<210> 59
<211> 18
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintética
50
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
55 <223> n es 5-metil citosina

<220>
<221> misc_feature
60 <222> (4)..(6)
<223> n es 5-metil citosina

<220>
65 <221> misc_feature
<222> (9)..(9)

ES 2 344 566 T3

<223> n es 5-metil citosina

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n es 5-metil citosina

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(16)

15 <223> n es 5-metil citosina

<400> 59

tntnnnagng tgngnnt

18

20

<210> 60

<211> 18

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (1)..(1)

<223> n es 5-metil citosina

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> n es 5-metil citosina

45

<400> 60

ntccaacmg tgcmgna

18

50

<210> 61

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

60

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

65

<223> n es 5-metil citosina

<220>

ES 2 344 566 T3

<220>

<223> Secuencia oligonucleotídica sintética

5 <400> 64

cctggtggac aacatcgccc tgt

23

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65