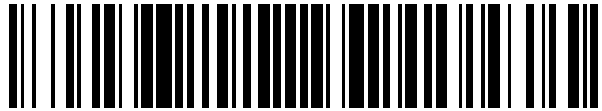


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 513**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/04** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2003 E 03788412 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1546180**

54 Título: **Uso de oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión de Akt-1**

30 Prioridad:

**16.08.2002 US 404010 P**

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

**20.09.2013**

73 Titular/es:

**REXAHN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
15245 SHADY GROVE ROAD, SUITE 455  
ROCKVILLE, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**YOON, HEEJEONG;  
MAO, LINGJUN;  
LEE, YOUNG BOK y  
AHN, CHANG-HO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 423 513 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

Uso de oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión de Akt-1

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos de oligonucleótidos antisentido, RX-0194, RX-0201, RX-0616, RX-0627, RX-0628, RX-0632 y RX-0638, que inhiben la expresión de una proteína humana, Akt-1, y también inducen citotoxicidad en varias líneas de células cancerosas.

**Antecedentes de la invención**

10 La proteína Akt-1 es una proteína de señalización que es producida en cantidades elevadas por varios tipos de células cancerosas humanas. Se cree que esta proteína participa, entre otras cosas, en un complejo proceso que transmite una señal de supervivencia a células bajo estrés, que puede permitir la supervivencia preferencial de células tumorales ayudándolas a evitar la progresión normal a apoptosis, o muerte celular. Esta proteína también participa en la transmisión de señales de control relacionadas con importantes funciones fisiológicas, tales como metabolismo de la insulina y síntesis de proteínas, además de diversos aspectos de crecimiento y diferenciación celular, que incluyen el crecimiento de plaquetas, células de la piel y fibroblastos. La alteración de la proteína Akt-1 puede tener un efecto pleiotrópico. Es decir, la mutación de la proteína puede producir múltiples efectos, aparentemente sin relacionar, dentro de las células de un animal. Estos efectos indican la importancia de Akt-1, y su posible utilidad en el tratamiento de enfermedad, siempre que pueda obtenerse la precisión apropiada en uso. Así, el objetivo aquí es inhibir la producción de Akt-1 en el contexto adecuado, es decir, cuando envía una señal de supervivencia no deseable a células cancerosas.

20 Akt-1 ejerce su efecto mediante un proceso conocido generalmente como señalización de células. La señalización de células es un mecanismo, o ruta biológica, que regula el crecimiento y la supervivencia celular. Diversos productos químicos producidos por el cuerpo, tales como factores de crecimiento y citocinas, sirven de señales extracelulares que interaccionan con la membrana de una célula. La membrana propaga las señales al interior de la célula, manifestándose diversos efectos biológicos. Una ruta de señalización se activa cuando una molécula de señalización externa, o ligando, se une a la membrana celular, y una proteína cinasa o una fosfatasa modifica una proteína diana en una localización específica sobre la molécula. Las proteínas cinasas son enzimas que (junto con otros materiales tales como fosfatasas) regulan la propagación de las señales extracelulares al interior de la célula. Las proteínas cinasas sirven para fosforilar proteínas en localizaciones específicas, concretamente en residuos de serina, treonina y tirosina. Como resultado, las cinasas se clasifican por su sitio de fosforilación específica. Akt-1 (por tanto, "PKB alfa y RAC-PK alfa") es un miembro de la familia AKT/PKB de serina/treonina cinasas. En muchas rutas de señalización pueden participar varias etapas usando diferentes cinasas. Una cinasa "aguas arriba" puede fosforilar, o activar, una proteína "diana aguas abajo", que a su vez puede ser una cinasa que tiene varias dianas. Frecuentemente se encuentra que las rutas de propagación de señales de células están alteradas en cáncer y otras afecciones de enfermedad. Tales cambios pueden indicar que esta ruta de señalización se afecta cuando las células pierden su mecanismo de señalización normal.

35 Por ejemplo, la actividad de tirosina cinasas, o señalización, se vuelve hiperactiva en las fases tempranas del desarrollo de cáncer, u oncogénesis. Una consecuencia de esta elevada actividad es un aumento de la actividad por otra cinasa, la PI 3 cinasa. Se sabe que la PI 3 cinasa activa varios miembros de la familia AKT/PKB, y se han observado niveles elevados de AKT/PKB en cánceres de mama u otros cánceres. En un estudio reciente, la función de Akt era el único factor que se encontró que se afectaba por un gen supresor de tumores alterado, PTEN, en moscas de la fruta (Stocker y col., *Science*, 2002, 295: 2088).

40 Debido a su efecto pleiotrópico sobre, es decir, su importancia para, muchas rutas metabólicas en la célula, Akt-1 se ha estudiado ampliamente como fármaco diana para cáncer y diabetes. Los inhibidores de cinasas aguas arriba para Akt-1 han sido el principal centro en el desarrollo de fármacos que podrían cambiar la función de Akt-1. Sin embargo, este enfoque todavía no había demostrado ser suficientemente específico, debido a que los inhibidores generalmente eran tóxicos para células.

Otras estrategias que tuvieron como objetivo inhibir la función de Akt-1 han implicado el uso de diversos inhibidores para las cinasas aguas arriba inmediatamente responsables de fosforilar Akt-1. Sin embargo, estas estrategias no son específicas para Akt-1, y también se alteraron otras proteínas importantes.

50 Se ha propuesto otro enfoque, concretamente usar oligonucleótidos antisentido, para modificar pequeñas porciones del gen que controla la expresión, o producción de, Akt-1.

55 La patente US 5.958.773 concedida a Monia y col., 28 de septiembre de 1999, se refiere al uso de diversos oligonucleótidos antisentido para la modulación de la expresión de ácidos nucleicos que codifican Akt-1. Los resultados se informan en términos de inhibición de la producción de Akt-1. Los oligonucleótidos específicos desvelados y reivindicados en la presente invención no se desvelaron en esa patente.

**Breve descripción de los dibujos**

- Fig. 1. Análisis por RT-PCR de la inhibición de Akt-1 por diversos oligonucleótidos
- Fig. 2. RX-0194 inhibe la expresión de ARNm de Akt-1 en diversas células cancerosas
- Fig. 3. RX-0201 inhibe la expresión de ARNm de Akt-1 en diversas células cancerosas
- 5 Fig. 4. Análisis de transferencia Western de inhibición de la expresión de proteínas Akt-1 por RX-0194 y RX-0201
- Fig. 5. Pruebas de citotoxicidad de diversos oligonucleótidos en células UMRC2
- Fig. 6. RX-0194 produce citotoxicidad celular en diversas células cancerosas
- Fig. 7. RX-0201 produce citotoxicidad celular en diversas células cancerosas
- Fig. 8A. RX-0201 produce pérdida de peso del tumor en ratones sin pelo implantados con células de glioblastoma de cerebro humano U251.
- 10 Fig. 8B. RX-0201 produce pérdida de peso del tumor en ratones sin pelo implantados con células de adenocarcinoma de próstata humano PC-3.
- Fig. 9A. RX-0201 prolonga la tasa de supervivencia al tumor en ratones sin pelo implantados con células de carcinoma renal humano Caki-1.
- 15 Fig. 9B. RX-0201 prolonga la tasa de supervivencia al tumor en ratones sin pelo implantados con células de adenocarcinoma de próstata humano PC-3.
- Fig. 9C. RT-0201 prolonga la tasa de supervivencia al tumor en ratones sin pelo implantados con células de carcinoma pancreático humano PANC-1.

**Descripción resumida de la invención**

- 20 La presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido que son elegidos como diana para un ácido nucleico que codifica Akt-1, y que modulan la expresión de Akt-1. También se proporciona un procedimiento para inhibir la expresión de Akt-1 en células que comprende poner en contacto las células con los compuestos y composiciones de oligonucleótidos de la invención. Una ventaja de los oligonucleótidos presentemente descritos es que, además de inhibir la expresión de Akt-1, tienen un efecto citotóxico sobre varias líneas de células cancerosas diferentes. Las ventajas de la presente invención pueden obtenerse poniendo en contacto células de diversas líneas de células cancerosas con un compuesto antisentido que es específicamente hibridable con un sitio en el gen Akt-1 que tiene la siguiente secuencia: 5' agtggactggtggggctgg 3' en el sitio 1.271 del gen Akt-1 (Genbank nº BC000479) (SEC ID Nº 1). Particularmente se prefiere RX-0194, que comprende 5' ccagccccaocagtccact 3' (SEC ID Nº 2). Pueden obtenerse ventajas similares con un compuesto que es antisentido para la secuencia 5' cgccaaggagatcatgcagc 3' en el sitio 1.478 del gen Akt-1 (Genbank nº BC000479) (SEC ID Nº 3). Particularmente se prefiere RX-0201, que comprende 5' gctcatgatctccttggcg 3' (SEC ID Nº 4). El contacto se produce en condiciones que permiten que el oligonucleótido se hibride con el gen que codifica Akt-1. Después de la hibridación, la capacidad de las células para producir Akt-1 se inhibe, y se reduce la viabilidad de células de cáncer. Además de los 2 oligonucleótidos anteriores, en la presente invención se describen 5 compuestos de oligonucleótidos antisentido adicionales que también regularon por disminución la expresión de ARNm de Akt-1 y produjeron efectos citotóxicos sobre líneas de células cancerosas. Las 5 secuencias adicionales son
- 30 RX-0616, que comprende 5' agatagctggtgacagacag 3' (SEC ID Nº 13) hibridable con el sitio que empieza en la posición 2101 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' ctgtctgtcaccagctatct 3' (SEC ID Nº 18, Genbank nº BC000479);
- 40 RX-0627, que comprende 5' cgtggagagatcatctgagg 3' (SEC ID Nº 14) hibridable con el sitio que empieza en la posición 2473 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' cctcatgatctctccagc 3' (SEC ID Nº 19, Genbank nº BC000479);
- RX-0628, que comprende 5' tcgaaaaggtcaagtgtctac 3' (SEC ID Nº 15) hibridable con el sitio que empieza en la posición 2493 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' gtgacttgaccttttcca 3' (SEC ID Nº 20, Genbank nº BC000479);
- 45 RX-0632, que comprende 5' tggcgcagcggcagcggcag 3' (SEC ID Nº 16) hibridable con el sitio que empieza en la posición 2603 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' ctgccgctgccgctgcacca 3' (SEC ID Nº 21, Genbank nº BC000479); y
- RX-0638, que comprende 5' ggcgcgagcggcggcctagc 3' (SEC ID Nº 17) hibridable con el sitio que empieza en la posición 170 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' gctagcggcggcggcggcggc 3' (SEC ID Nº 22, Genbank
- 50

nº BC000479).

### **Descripción detallada de la invención**

La reciente caracterización de la familia de AKT (algunas veces denominadas PKB) de serina/treonina cinasas, los materiales que promueven o inhiben su producción por células, es decir, sus “reguladores aguas arriba”, y los materiales por los que actúa, es decir, sus “sustratos” o “dianas aguas abajo”, no cubrió funciones esenciales para esta familia en el crecimiento, supervivencia y metabolismo celular. La PKB (proteína cinasa B) se encontró originalmente como un oncogén retroviral. Actualmente se han caracterizado tres variantes de la familia AKT, Akt-1, Akt-2 y Akt-3. En varios cánceres, los genes Akt se amplifican, o la proteína se expresa en exceso, que indica la importante función que desempeña cuando las células se vuelven malignas. AKT/PKB es una serina/treonina cinasa regulada por factor de crecimiento que contiene un dominio PH (homología con pleckstrina). Este dominio PH interactúa con productos de lípido de PI 3K (fosfatidilinositol 3-cinasa), fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato que inicia la translocalización de Akt-1 del citosol de una célula a su membrana plasmática. Esta translocalización se requiere con el fin de presentar AKT/PKB a una cinasa de activación aguas arriba, PDK1 (cinasa 1 dependiente de fosfoinositida). Se sabe que una variedad de factores de crecimiento tal como PDGF, EGF, insulina, trombina y NGF activan la translocalización de AKT/PKB. Se ha mostrado que Akt-1 induce supervivencia celular y suprime la muerte apoptótica de varios tipos de células inducidas mediante una variedad de estímulos, que incluyen retirada de factores de crecimiento, alteración del ciclo celular y pérdida de adhesión de células. La forma activada de la proteína AKT/PKB fosforila numerosos sustratos, que incluyen GSK-3 (glucógeno sintasa cinasa 3), eNDS (óxido nítrico sintasa endotelial), FKHR 1 (miembro 1 de la familia de factores de transcripción forkhead), Bad (miembro de la familia pro-apoptótica Bcl-2) y p21 CIP (inhibidor de la progresión del ciclo celular). Estas acciones pueden producir diversos efectos biológicos tales como supresión de apoptosis, control del metabolismo de la glucosa, proliferación celular, transcripción, traducción, migración y angiogénesis celular. Akt-1 tiene una actividad antiapoptótica que se correlaciona con su activación cuando las células se vuelven cancerosas. Se cree que la fosforilación de Akt-1 desencadena la localización núcleo-citoplásmica de sustratos que participan en ciclo y apoptosis celular. Esto conduce a una multitud de eventos que culminan en tumor maligno, que incluye autonomía de señales de crecimiento adquiridas, insensibilidad a señales apoptóticas, replicación ilimitada, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis.

Dada la esencial función de la familia AKT/PKB de serina/treonina cinasas en el desarrollo de cánceres, se desearía inhibir su funcionamiento durante la oncogénesis. Sin embargo, también sería deseable, al grado posible, evitar interrumpir las funciones de la familia en otros aspectos del metabolismo celular. Un enfoque podría ser identificar el gen que codifica una cinasa probablemente oncogénica, e idear un oligonucleótido antisentido que pueda usarse para inhibir la actividad de ese gen en el contexto correcto. El documento USPN 5.958.773 informó de una amplia variedad de oligonucleótidos antisentido que pueden usarse para inhibir la producción de Akt-1 en células cancerosas. Los inventores han encontrado que varios oligonucleótidos antisentido tanto presentan una capacidad potenciada para inhibir la producción de proteína por el gen Akt-1 como además inducen citotoxicidad en una variedad de líneas de células cancerosas.

Un compuesto antisentido es una herramienta que puede usarse para introducir modificaciones en los ácidos nucleicos encontrados en células vivas. El término “antisentido” se refiere a la noción de que los ácidos nucleicos “codifican” proteínas. Es decir, la secuencia de nucleótidos encontrada en un ácido nucleico dado determina, entre otras cosas, qué proteína se producirá. Una secuencia “sentido” para un gen completo dará una proteína normal en la cantidad usual, en respuesta a un estímulo dado. Un oligonucleótido “sentido” se hibridará con una secuencia de genes normal, y no afectará la cantidad de, o propiedades de, la proteína. Una secuencia “no sentido” no dará un producto, o puede dar un producto no funcional. Por ejemplo, si un codón u oligómero “no sentido” se inserta en un gen, puede resultar una proteína no funcional truncada. Un oligonucleótido “antisentido” se hibridará con un gen normal, pero dará una proteína alterada con respecto a su estructura, o cantidad. Se ha encontrado que oligómeros antisentido, es decir, compuestos antisentido que son relativamente cortos, pueden insertarse fácilmente en células, alterando la función del gen.

Los compuestos antisentido se usan comúnmente como reactivos de investigación para la exploración de la función del gen debido a que pueden alterar la expresión génica con especificidad exquisita, y pueden usarse para dilucidar la función de genes particulares. Pueden usarse compuestos antisentido, por ejemplo, para distinguir entre funciones de diversos miembros de una ruta biológica.

Pueden usarse oligonucleótidos antisentido para bloquear selectivamente genes causantes de enfermedad, inhibiendo así la producción de proteínas asociadas a enfermedad. Algunos oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos, y actualmente están en marcha numerosos ensayos clínicos. Así, es posible que los oligonucleótidos puedan usarse para tratar células, tejidos y animales, especialmente seres humanos. En el contexto de la presente invención, el término “oligonucleótido” se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases que se producen naturalmente, azúcares e enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), además de oligonucleótidos que tienen porciones que no se producen naturalmente que funcionan similarmente. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren frecuentemente con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación

celular potenciada, afinidad potenciada por una diana de ácido nucleico y elevada estabilidad en presencia de nucleobases.

La presente invención emplea compuestos de nucleótidos oligoméricos, particularmente oligonucleótidos antisentido, que son elegidos como diana por una parte de un ácido nucleico que codifica Akt-1 y que modulan la expresión de Akt-1. Los compuestos de oligonucleótidos se diseñan para hibridarse específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican Akt-1. Un oligonucleótido, RX-0194, es elegido como diana por un sitio sobre el gen Akt-1 que tiene la siguiente secuencia: 5' agtggactggtggggctgg 3' en el sitio 1.271 del gen Akt-1 (Genbank nº BC000479) (SEC ID Nº 1). La secuencia para el esqueleto de RX-0194 es complementaria a este sitio. Los inventores han encontrado que oligómeros que comprenden tanto 5 como 10 nucleótidos aguas arriba y aguas abajo de la secuencia de la que se derivó el 20-mero de RX-0194 mostraron una inhibición medible de la expresión de ARN de Akt-1. El otro oligonucleótido, RX-0201, es elegido como diana por un sitio en la región codificante del gen Akt-1 que tiene la siguiente secuencia: 5'-cgccaaggagatcatgcagc 3' en el sitio 1.478 del gen Akt-1 (Genbank nº BC000479) (SEC ID Nº 3). La secuencia para el esqueleto de RX-0201 es complementaria a este sitio. Los inventores han encontrado que este oligonucleótido es más sensible a variabilidad, y que mientras que el 18-mero de RX-0201 mostró algo de inhibición de la expresión de ARNm de Akt-1, más truncación de cualquier extremo produjo una pérdida sustancial de inhibición de la expresión de ARNm de Akt-1. Los oligómeros que comprenden tanto como 5 como 10 nucleótidos aguas arriba y aguas abajo de la secuencia de la que se derivó el 20-mero de RX-0194 demostraron una inhibición de la proliferación de células cancerosas. Las versiones truncadas de RX-0194 y RX-020 también mostraron una inhibición de la proliferación de células cancerosas. Además de los 2 oligonucleótidos anteriores, en la presente invención se describen 5 compuestos de oligonucleótidos antisentido adicionales que también regularon por disminución la expresión de ARNm de Akt-1 y produjeron efectos citotóxicos sobre líneas de células cancerosas. Las 5 secuencias adicionales son

RX-0616, que comprende 5' agatagctggtgacagacag 3' (SEC ID Nº 13) hibridable con el sitio que empieza en la posición 2101 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' ctgtctgtcaccagctatct 3' (SEC ID Nº 18, Genbank nº BC000479);

RX-0627, que comprende 5' cgtggagagatcatctgagg 3' (SEC ID Nº 14) hibridable con el sitio que empieza en la posición 2473 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' cctcagatgatctctccagc 3' (SEC ID Nº 19, Genbank nº BC000479);

RX-0628, que comprende 5' tcgaaaaggtcaagtctac 3' (SEC ID Nº 15) hibridable con el sitio que empieza en la posición 2493 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' gtgacctgaccttttcga 3' (SEC ID Nº 20, Genbank nº BC000479);

RX-0632, que comprende 5' tggtcagcggcagcggcag 3' (SEC ID Nº 16) hibridable con el sitio que empieza en la posición 2603 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' ctgccgctgccgctgcacca 3' (SEC ID Nº 21, Genbank nº BC000479); y

RX-0638, que comprende 5' ggccgagcgcgggctagc 3' (SEC ID Nº 17) hibridable con el sitio que empieza en la sitio de posición 170 del gen Akt-1, que tiene la siguiente secuencia: 5' gctaggcccgcgctcgcgcc 3' (SEC ID Nº 22, Genbank nº BC000479).

Elegir como diana un compuesto antisentido para un gen particular significa identificar la secuencia de ácidos nucleicos de interés, y seleccionar uno o más sitios dentro de la secuencia de ácidos nucleicos que va a modificarse. Una vez se ha identificado el sitio diana, se elige un oligonucleótido que es suficientemente complementario al sitio diana, de manera que se hibridará específicamente con el sitio, es decir, se hibridará suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico que codifica Akt-1" engloba ADN que codifica Akt-1, ARN (incluyendo pre-ARNm) transcrito a partir de tal ADN, y también ADNc derivado de tal ARN. La hibridación específica de un compuesto oligomérico antisentido con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Las funciones de ADN que van a interferirse incluyen replicación y transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ADN al sitio de traducción de proteínas, traducción de proteína a partir del ARN, corte y empalme del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede entablarse o facilitarse por el ARN. El efecto global de tal interferencia con la función de ácido nucleico diana es la modulación de la expresión, o producción de, una proteína. En el contexto de la presente invención, "modulación" significa tanto un aumento (estimulación) como una disminución (inhibición) en la expresión de un gen. Para los presentes fines, el gen que codifica Akt-1 se modula de manera que se inhiba la expresión de Akt-1.

En el contexto de la presente invención, "hibridar" se refiere a enlace de hidrógeno, que puede ser mediante enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen invertido, entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarias. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. "Complementario", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una posición cierta de un

oligonucleótido puede formar un enlace de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARNm se consideran que son complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula es ocupado por nucleótidos que pueden formar enlace de hidrógeno entre sí. Así, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso, de forma que se produzca unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ADN o ARN. Se entiende en la materia que la secuencia de un compuesto antisentido no necesita ser el 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto con la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido con secuencias no diana en condiciones en las cuales se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las cuales se realizan los ensayos.

Mientras que los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida de compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligoméricos que incluyen, pero no se limitan a, miméticos de oligonucleótidos tal como se describen más adelante. Los compuestos antisentido según la presente invención comprenden preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleobases. Particularmente se prefieren oligonucleótidos antisentido que comprenden aproximadamente 20 nucleobases (es decir, aproximadamente 20 nucleósidos ligados). Como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen adicionalmente un grupo fosfato ligado covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede ligarse en cualquiera del resto 2', 3' o 5'-hidroxilo del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato enlazan covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal pueden unirse adicionalmente para formar una estructura circular, sin embargo, generalmente se prefieren estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura del oligonucleótido, comúnmente se denomina que los grupos fosfato forman el esqueleto internucleosídico del oligonucleótido. El enlace o esqueleto normal de ARN y ARN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Como se define en esta memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de esta memoria descriptiva, y como algunas veces se ha citado en la materia, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleosídico también pueden considerarse que son oligonucleósidos.

Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros fosfonatos de alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfonatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos ligados en 2'-5' de éstos, y aquellos que tiene polaridad invertida en los cuales los pares adyacentes de unidades de nucleósido están ligados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en su interior tienen esqueletos que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomos mixtos y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH<sub>2</sub> mixtos.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el enlace de azúcar como el internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de oligonucleótido que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción de amida del esqueleto.

Las realizaciones más preferidas de la invención son oligonucleótidos con esqueletos fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomos, y en particular -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- [conocidos como un esqueleto metileno (metilimino) o MMI], -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- y -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-

CH<sub>2</sub>- [en los cuales el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa -O-P-O-CH<sub>2</sub>-]. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en los cuales el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> o alqueno C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> y alquino sustituido o sin sustituir. Particularmente se prefieren O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, siendo n y m de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo saliente de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., *Helv. Chim. Acta* 78:486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida incluye 2'-dimetilaminoxietoxi, es decir, un grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en ejemplos en la presente memoria más adelante.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos ligados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos del azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente "base"). Como se usa en la presente memoria, nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halógeno, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Ciertas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C y actualmente se prefieren sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil-azúcar.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica ligar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen, pero no se limitan a, restos de lípido tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio, una cadena de poliamina o de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado estén uniformemente modificadas y, de hecho, más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras" en el contexto de la presente invención son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, representando cada una al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región en la cual el oligonucleótido se modifica de manera que se confiera al oligonucleótido un aumento de la resistencia a la degradación por nucleasas, aumento de la captación celular y/o aumento de la afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir de sustrato para enzimas que pueden escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. Por tanto, la activación de RNasa H produce la escisión de la ARN diana, potenciándose así enormemente la eficiencia de la inhibición de oligonucleótidos de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, asociarse técnicas de hibridación de ácidos nucleicos conocidas en la técnica.

Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la materia híbridos o gámpmeros.

5 Los compuestos antisentido usados según la presente invención puede prepararse convenientemente y rutinariamente por la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis es comercializado por varios vendedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualquier otro medio para tales síntesis conocidas puede emplearse adicionalmente o alternativamente. Es muy conocido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

10 Los compuestos antisentido de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico, o construcciones de vector genético diseñadas para dirigir la síntesis *in vivo* de moléculas antisentido. Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos como, por ejemplo, liposomas, moléculas elegidas como diana por receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras formulaciones, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción.

15 Los compuestos antisentido de la invención engloban cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster o sal de tales ésteres, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal que incluye un ser humano, pueda proporcionar (directamente o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la divulgación también se refiere a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes.

20 El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otros productos y/o condiciones. En particular, versiones de profármaco de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados de SATE [fosfato de (S-acetil-2-tioetilo)].

25 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo.

30 Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

35 Los compuestos de la invención pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto antisentido a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los compuestos y procedimientos antisentido de la invención también puede ser útil profilácticamente, por ejemplo, para, por ejemplo, prevenir o retardar la infección, inflamación o formación de tumor.

40 Los compuestos antisentido de la invención son útiles para investigación y diagnóstico debido a que estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican Akt-1, permitiendo que se construyan fácilmente ensayos de sándwich y otros ensayos para explotar este hecho. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido de la invención con un ácido nucleico que codifica Akt-1 puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También puede prepararse kits que usan tales medios de detección para detectar el nivel de Akt-1 en una muestra.

45 La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas, que incluye administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección 50 o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración por vía oral.

55 Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, sprays, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u aceitosas, espesantes y similares.



Composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobres o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes.

5 Composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no se limitan a, promotores de la penetración, compuestos de vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos previamente formados, sólidos auto-emulsionantes y semisólidos auto-emulsionantes.

### **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos ilustran la práctica de diversos aspectos de las presentes invenciones. No limitan las invenciones, o las reivindicaciones, que siguen.

#### **15 Ejemplo 1 - Cultivo de líneas de células cancerosas**

Las células cancerosas usadas para determinar el efecto de los compuestos de oligonucleótidos se obtuvieron de las siguiente fuentes: OVCAR-3 humanas (ovario), MCF-7 (mama, dependiente de hormonas), HeLa (cuello uterino), PC3 (próstata), HepG2 (hígado), A549 (pulmón), Caki-1 (riñón), HT-29 (colon) y PANC-1 (páncreas) de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) (Manassas, VA); U251 (cerebro) de Riken (Japón); MKN-45 (estómago) de DSMZ (Alemania); UMRC2 (riñón) y Lox IMVI (melanoma) del Instituto nacional del cáncer estadounidense (Bethesda, MD). Todas las líneas celulares, excepto UMRC2, Caki-1 y PANC-1, se cultivaron en medio RPMI1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 10% de suero bovino fetal ("SBF"), piruvato de sodio 1 mM, HEPES 10 mM y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina ("P/S"). Las células UMRC2, Caki-1 y PANC-1 se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM", Invitrogen) complementado con 10% de SBF, P/S, HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM. Todas las células se incubaron a 37 °C bajo 5% de CO<sub>2</sub> humidificado.

#### **Ejemplo 2 - Síntesis de oligonucleótidos**

Se seleccionaron diversas secuencias de nucleótidos encontradas en la región codificante del gen Akt-1 humano conocida como la pauta abierta de lectura ("ORF") y la región sin traducir 3' ("3' UTR") como dianas, y se sintetizaron los oligonucleótidos complementarios correspondientes. El esqueleto de cada oligonucleótido se modificó durante la síntesis para introducir enlaces fosforotioato entre nucleótidos, excepto en los extremos 3' y 5', de manera que resultó un oligonucleótido antisentido.

Oligonucleótidos localizados en la región codificante de Akt-1 se sintetizaron usando el sintetizador de ADN 8909 Expedite de Applied Biosystems, Foster City, CA ("ABI"). La síntesis de fosforotioatos se realizó de la misma manera que para los oligonucleótidos de fosfodiéster correspondientes, excepto que la botella de oxidación convencional se sustituyó con 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona 0,2 M en acetonitrilo para la tianción escalonada de los enlaces fosfito. Después de la escisión de la columna de vidrio de tamaño de poro controlado y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado, el compuesto de oligonucleótido se calentó en presencia de hidróxido de amonio a 55 °C durante la noche. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se evaporó hidróxido de amonio por Speedvac plus y el sistema de vacío UVS400 Universal (Thermo Savant, Holbrook, NY). El oligonucleótido se precipitó con NaOAc 75 mM, pH 7,2 y 2,5 volúmenes de alcohol etílico y se lavó una vez con alcohol etílico. El oligonucleótido se disolvió en agua y la concentración de oligonucleótido se midió por espectrofotómetro UV.

#### **Ejemplo 3 - Transfección**

Se usó el reactivo lipofectamina PLUS en procedimientos de transfección para análisis de ARN y proteínas. El día antes de la transfección, las células se tripsinaron, se contaron y se sembraron en placa. Para la placa de 6 pocillos, cada pocillo se sembró con  $2,5 \times 10^5$  células de UMRC2 de manera que alcanzarán el 50-90% de confluencia en el día de la transfección. Todos los reactivos y medios usados para el experimento de transfección se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Se prepararon las siguientes disoluciones en tubos estériles: Disolución A: para cada transfección, una mezcla de 2 µl (0,5 µg) de ADN, 100 µl de medio sin suero ("Opti-MEM") y 3 µl de reactivo PLUS se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Disolución B: para cada transfección, una mezcla de 2,5 µl del reactivo lipofectamina y 100 µl de medio sin suero (Opti-MEM). Las disoluciones A y B se combinaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para la transfección, las células se lavaron una vez con 2 ml de medio sin suero (Opti-MEM) o PBS y 800 µl de medio sin suero (Opti-MEM) se añadieron a cada pocillo. La disolución A y B combinada se añadió a cada pocillo y se mezcló suavemente. Posteriormente, las células se incubaron durante 3 a 4 horas a 37 °C, el medio se sustituyó con medio regular y se incubó durante el tiempo indicado. Se usaron dos reactivos de transfección diferentes para realizar mediciones de CI<sub>50</sub> de inhibición del crecimiento celular. Además del reactivo lipofectamina PLUS descrito anteriormente, también se usó lipofectamina 2000. El procedimiento usando lipofectamina 2000 fue el mismo que se ha descrito anteriormente, excepto que se

omitió la etapa de lavado usando PBS o medio sin suero. Los valores de  $CI_{50}$  usando lipofectamina PLUS y lipofectamina 2000 se muestran en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

#### Ejemplo 4 - Inhibición de la expresión de ARNm de Akt-1 por oligonucleótidos antisentido

5 Los oligonucleótidos antisentido se probaron entonces para su capacidad para regular por disminución, o inhibir, la expresión de ARNm que codifica Akt-1. El nivel de expresión de ARNm de Akt-1 en células transfectadas con los oligonucleótidos antisentido se midió por análisis por RT-PCR. Se tomaron muestras 6 horas después de la transfección, se aisló ARN y se sometió a análisis por RT-PCR.

10 Células UMRC2 ( $2,5 \times 10^5$  células por pocillo) en una placa de 6 pocillos se transfectaron con los oligonucleótidos experimentales y las células transfectadas se usaron para aislar ARN total. El ARN total se aisló usando el kit RNA-STAT (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX), según el manual del proveedor [véase también Chomczynski, P. y Sacchi, N en Anal. Biochem. 162: 156-159 (1987)]. Brevemente, los medios se eliminaron de las dos placas de 6 pocillos y se añadieron 0,5 ml totales de disolución RNA-STAT y se mezclaron pipeteando varias veces, y se transfirieron a un tubo Eppendorf. Se añadieron 0,1 ml de cloroformo al tubo, y el tubo se agitó vigorosamente durante 15 segundos, y luego se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente antes de la centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La capa superior se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 0,3 ml de isopropanol y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el ARN precipitado se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento resultante se lavó con 70% de etanol, se secó brevemente y se reconstituyó con 20  $\mu$ l de agua. La concentración de ARN se determinó por espectrofotómetro. La reacción de RT se llevó a cabo usando el kit enzimático M-MLV (Invitrogen). Se usaron 5  $\mu$ g de ARN total para sintetizar ADNc en 20  $\mu$ l de reacción RT. Se sintetizó ADN de la primera hebra incubando ARN total, mezcla de oligo dT (0,5 mg) y dNTP (0,5 mM) a 65 °C durante 5 minutos y enfriando rápidamente sobre hielo. Se añadió tampón de la primera hebra, DTT 7,4 mM y 1  $\mu$ l de transcriptasa inversa M-MLV (200 unidades) a la mezcla de reacción anterior y se incubó a 37 °C durante 50 minutos y la inactivación de la enzima se siguió a 70 °C durante 15 minutos. El ADNc de Akt-1 sintetizado por reacción de RT se midió por PCR usando mezcla de PCR Sapphire (SuperBio Inc., Seúl, Corea) con cebadores apropiados. Para la detección de ARNm de Akt-1, cebadores, 5' CTGGACAAGGACGGGCACA 3' (SEC ID N° 5) y 5' GGTGGGCTGAGCTTCTTCTCGTA 3' (SEC ID N° 6). Se usó beta-actina como control de PCR interno. Los cebadores para beta-actina fueron 5' CCCATGCCATCCTGCGTCTG 3' (SEC ID N° 7) y 5' ACGGAGTACTTGCGCTCAG 3' (SEC ID N° 8). Los productos de PCR se analizaron sobre 1,5% de gel de agarosa por electroforesis.

30 Inicialmente se cribaron un total de 86 oligonucleótidos y los resultados de once se muestran en la Tabla 1, a continuación, y también en la Fig. 1. Cada oligonucleótido se volvió a probar para confirmar la regulación por disminución del nivel de expresión de ARNm. Cada reacción se realizó por duplicado.

**TABLA 1. Expresión de ARNm de Akt-1 inhibida**

Rexahn nº	Región	Sitio diana*	5'-secuencia-3'	SEC ID N°	% de inhibición
RX-0020	Codificante	695	ggtgcttgggcttgccagg	9	92
RX-0024	3'UTR	1961	ctgagggctgagggcacacc	10	81
RX-0194	Codificante	1271	ccagccccaccagtccact	2	82
RT-0241	Codificante	1478	gctgcatgatccttggcg	4	90
RX-0203	Codificante	1202	gtccgcaaaaggcttc	11	40
RX-0204	3'UTR	1757	gcctctccatccctccaa	12	16
RX-0616	3'UTR	2101	agatagctggtgacagacag	13	20
RX-0627	3'UTR	2473	cgtggagagatcatctgagg	14	50
RX-0628	3'UTR	2493	tcgaaaaggccaagtctac	15	40
RX-0632	3'UTR	2603	tggtgcagcggcagcggcag	16	76
RX-0638	5'UTR	170	ggcgcgagcgcggcctagc	17	85

\*Genbank nº BC000479

35 RX-0203 y RX-0204 son secuencias desveladas en la patente US 5.958.773, como sitios diana nº 1116 y 1671, respectivamente (Genbank nº M613167). Éstas se eligieron como representativas de dos regiones encontradas en la referencia, las regiones ORF y 3' UTR del gen Akt-1, presentando ambas el mayor % de inhibición para esa región según la prueba usada en esa referencia. Todos los otros oligonucleótidos tienen nuevas secuencias diseñadas por los inventores. Todas las nuevas secuencias presentaron % de inhibición potenciado o comparable con respecto a la referencia usando la prueba descrita en la presente memoria. Sin embargo, se encontró que el % de inhibición no se correlacionó con la citotoxicidad, como se trata más adelante en el Ejemplo 6. Posteriormente, dos oligonucleótidos que presentaron ambos alto % de inhibición de la expresión de ARNm de Akt-1 en células UMRC2 y citotoxicidad se seleccionaron para probar en otras líneas de células cancerosas. También se probaron 5 secuencias adicionales para citotoxicidad en líneas de células cancerosas.

45 La Fig. 2 muestra regulación por disminución del nivel de ARNm de Akt-1 en diez líneas de células cancerosas (UMRC2, OVCAR-3, MKN-45, A549, PC3, U251, Lox IMVI, HeLa, HepG2 y MCF-7) después de la transfección con RX-0194 0,1  $\mu$ M. Se observó regulación por disminución de alto nivel de las líneas celulares Akt-1 en Lox IMVI,

U251, PC-3, OVCAR-3, MKN-45, HeLa y A549, se encontró regulación por disminución de nivel moderado en MCF-7 y UMRC2 y se observó regulación por disminución de bajo nivel en HepG2.

La Fig. 3 muestra la regulación por disminución del nivel de ARNm de Akt-1 en diez líneas de células cancerosas (UMRC2, OVCAR-3, MKN-45, A549, PC3, U251, Lox IMVI, HeLa, HepG2 y MCF-7) después de la transfección con RX-0201 0,3  $\mu$ M. Se observó regulación por disminución de marcada a moderada de Akt-1 en todas las líneas celulares, excepto en células MCF-7, que mostraron un bajo nivel de regulación por disminución.

#### Ejemplo 5 - Análisis de transferencia Western de niveles de proteína Akt-1

Se transfectaron diversas líneas de células cancerosas como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3 con los oligonucleótidos RX-0194 y RX-0201 preferidos a una concentración de tanto 0,1 como 0,3  $\mu$ M. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, las células se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron con el tampón de lisis que contenía Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, 1% de Triton X-100 e inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN). Las células se sonicaron tres veces por pulsos de 10 segundos usando un sonicador Branson 450 y después de la centrifugación de 15 minutos a 14.000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El reactivo de ensayo de proteína BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) se usó para medir la concentración de proteína. Los extractos de células en bruto se usaron para determinar la expresión de proteína Akt-1 por SDS-PAGE y posterior análisis Western usando un anticuerpo anti-Akt1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se usó anticuerpo anti-beta-actina (Santa Cruz Biotechnology) como control interno. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Tanto RX-0194 como RX-0201 demostraron inhibición de la expresión de la proteína Akt-1, a un mayor o menor grado en todas las líneas celulares.

#### Ejemplo 6 - Prueba de citotoxicidad de células

Se usaron líneas de células cancerosas humanas para probar la citotoxicidad celular de oligonucleótidos experimentales. Se usó el procedimiento de sulforodamina B ("SRB") [Skehan y col., *J. National Cancer Institute*, 82: 1107-1112 (1990)] para evaluar la supervivencia de células después de la transfección de RX-oligonucleótido.

Se sembraron células sobre una placa de 96 pocillos y se transfirieron con los oligonucleótidos al día siguiente. Tras un periodo de incubación de 72 horas, las células supervivientes se tiñeron con sulforodamina B y se midieron usando un lector de microplacas. Brevemente, se sembraron 1.000-10.000 células sobre cada pocillo en una placa de 96 pocillos y se transfectaron con oligómeros experimentales usando el reactivo lipofectamina PLUS (Invitrogen). Después de 3 a 4 horas de incubación, el agente de transfección se eliminó y se añadió medio fresco a cada pocillo. Después de 72 horas de incubación, el medio se eliminó. Las células se fijaron con 10% de ácido tricloroacético ("TCA"), se incubaron durante 1 hora a 4 °C y se lavaron 4 veces con agua de grifo. Posteriormente, las células se tiñeron con 0,4% de sulforodamina B en 1% de ácido acético durante 30 minutos, se lavaron 4 veces con 1% de ácido acético y se secaron de nuevo al aire. Después de 5 minutos de agitación en disolución Tris 10 mM, la densidad óptica de las muestras se leyó a 530 nm usando el lector de microplacas Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Los compuestos experimentales que mostraron regulación por disminución de ARNm de Akt-1 se usaron para probar su efecto sobre la viabilidad de células UMRC2. La Fig. 5 muestra resultados para RX-0020, RX-0024, RX-0194 y RX-0201. RX-0194 y RT-0201 mostraron el efecto citotóxico celular más potente en comparación con los otros oligonucleótidos probados. De forma interesante, RX-0020 y RX-0024, los nuevos oligonucleótidos que habían presentado el 92 y 81% de inhibición de ARNm, respectivamente, no presentaron tanta citotoxicidad como RX-0194 y RT-0201.

Los dos mejores candidatos, RX-0194 y RX-0201, se cribaron para citotoxicidad contra una variedad de líneas de células cancerosas. Como se muestra en la Fig. 6, RX-0194 redujo la viabilidad celular en las siguientes líneas de células cancerosas humanas; PC3 (próstata), U251 (cerebro), HeLa (cuello uterino), OVCAR-3 (ovario), Lox IMVI (melanoma), HepG2 (hígado), MCF-7 (mama), UMRC2 (renal), MKN-45 (estómago) y A549 (pulmón). La citotoxicidad celular de RX-0194 aumentó con la concentración de RX-0194 entre diferentes líneas celulares probadas. 0,1  $\mu$ M de RX-0194 en PC3, U251, HeLa, OVCAR-3 y UMRC2 produjo más del 50% de muerte celular. Pero más del 50% de células en Lox IMVI, HepG2, MCF-7, MKN-45 y A549 sobrevivieron a 0,1  $\mu$ M. La Fig. 7 muestra que se obtuvieron resultados similares para RX-0201. De nuevo, la citotoxicidad de RX-0201 se demostró en 10 líneas celulares, y aumentó con concentración a grados variables entre las diferentes líneas celulares. 0,1  $\mu$ M de RX-0201 produjo más del 50% de muerte celular en PC3, U251, HeLa, OVCAR-3, HepG2, MKN-45 y UMRC2, pero sobrevivieron más del 50% de Lox IMVI, MCF-7 y A549.

#### Ejemplo 7 - Medición de $CI_{50}$ de citotoxicidad celular para los oligonucleótidos RX-0194 y RX-0201

Los oligonucleótidos experimentales se cribaron para dosificación eficaz relativa. Se transfectaron diez líneas de células cancerosas diferentes con RX-0194 o RX-0201 a concentraciones que oscilaron de 0,01  $\mu$ M a 1  $\mu$ M usando el reactivo lipofectamina PLUS y, después de 72 horas después de la transfección, las células se tiñeron con sulforodamina B y el número de células supervivientes se contó usando un lector de microplacas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories). El valor de  $CI_{50}$ , o concentración de fármaco necesaria para destruir la mitad de las células, se calculó usando el programa de software KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA). Los resultados se informan en la

Tabla 2, a continuación.

**TABLA 2**

Célula RX-	CI <sub>50</sub> (µM)									
	PC3	U251	HeLa	OVC AR-3	Lox-IMVI	Hep G2	MCF 7	UMR C2	MKN -45	A549
0194	0,098	0,046	0,08	0,034	0,31	0,2	0,47	0,1	0,17	0,13
0201	0,096	0,039	0,11	0,036	0,18	0,066	0,2	0,1	0,093	0,11

5 Para comparación, se observa que la CI<sub>50</sub> para UMRC2 es 0,1 µM para RX-0194 y 0,1 µM para RX-0201. Cuando los compuestos RX-0203 y RX-0204 se probaron del mismo modo, los valores de CI<sub>50</sub> para UMRC2 fueron 0,35 µM y 0,44 µM, respectivamente. Es decir, se necesitó tres a cuatro veces más de RX-0203 y RX-0204 para obtener los mismos resultados que con los compuestos más nuevos.

10 Se usaron RX-0194, RX-0201, RX-0203 y RX-0204 junto con los 5 oligonucleótidos adicionales, RX-0616, RX-0627, RX-0628, RX-0632 y RX-0638 para transfectar diversas células cancerosas usando el reactivo lipofectamina 2000 a 0,1 a 0,001 µM. Después de 72 horas, las células se tiñeron con sulfurodamina B y el número de células supervivientes se contó usando un lector de microplacas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories). El valor de CI<sub>50</sub>, o concentración de fármaco necesaria para destruir la mitad de las células, se calculó usando el programa de software KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA). Los resultados se informan en la Tabla 3, a continuación.

**TABLA 3**

Línea celular	CI <sub>50</sub> (µM)					
	RX-0201	RX-0616	RX-0632	RX-0627	RX-0628	RX-0638
UMRC2	0,015	0,017	0,014	0,018	0,020	0,028
Caki-1	0,0092	0,0080	0,0040	0,0042	0,0058	0,014
A549	0,0067	0,0086	0,0036	0,0054	0,011	0,014
HeLa	0,012	0,012	0,014	0,0086	0,014	0,021
PANC-1	0,028	0,044	0,034	0,040	0,041	0,049
U251	0,0050	0,011	0,016	0,0056	0,0086	0,015
PC3	0,018	0,036	0,041	0,017	0,056	0,037
HT29	0,042	0,062	0,076	0,043	0,051	0,038
MKN-45	0,0064	0,0059	0,013	0,0062	0,0071	0,011
OVCAR-3	0,0033	0,0095	0,0051	0,0035	0,0038	0,0037
HepG2	0,019	0,023	0,032	0,021	0,036	0,028
MCF7	0,020	0,020	0,028	0,020	0,027	0,024
Lox IMVI	0,018					

15 Similar a los resultados de citotoxicidad obtenidos con el reactivo lipofectamina PLUS, los valores de CI<sub>50</sub> para RX-0203 y RX-0204 fueron 3 a 6 veces superiores a aquellos de RX-0201 cuando se usó el reactivo lipofectamina 2000 para la transfección en varias líneas de células cancerosas. Estos resultados indican que RX-0201 fue más eficaz en inducir citotoxicidad que los compuestos de la técnica anterior. Además, se obtuvieron resultados comparables a aquellos obtenidos con RX-0201 con RX-0616, RX-0632, RX-0626 y RX-0638. Como se muestra en la Tabla 3, los valores de CI<sub>50</sub> fueron significativamente inferiores cuando se usó el reactivo lipofectamina 2000 para las mediciones.

20

**Ejemplo 8: Variabilidad de secuencias**

Con el fin de determinar si el esqueleto 20-mero completo de RX-0194 y RX-0201 se requiere o no para regular por disminución la expresión de ARNm de Akt-1, se sintetizaron oligonucleótidos 18-, 16-, 14- y 10-meros y se analizaron sus efectos sobre la expresión de ARNm y citotoxicidad. Los datos de análisis por RT-PCR indicaron que las versiones 18-, 16- y 14-meras de RX-0194 mostraron inhibición más fuerte de la expresión de ARNm de Akt-1 que la versión 20-mera de RX-0194. Esto sugiere que la truncación de secuencias de RX-0194 hasta el 14-mero no afectó adversamente la inhibición deseada de la expresión de ARNm de Akt-1. Sin embargo, el 10-mero de RX-0194 no mostró mucha inhibición. Para RX-0201, la versión 18-mera de RX-0201 mostró algo de inhibición de la expresión de ARNm de Akt-1. Sin embargo, cuando la secuencia se truncó a las versiones 16-, 14- y 10-meras de RX-0201, la inhibición se volvió insignificativa. Esto indica que para RX-0201, la secuencia de longitud completa 20-mera se requiere para lograr la máxima inhibición de la expresión de ARNm de Akt-1.

Conjuntamente con los datos anteriores, los presentes inventores observaron que los oligómeros que comprenden tanto 5 como 10 nucleótidos, tanto aguas arriba como aguas abajo de la secuencia de la que se derivó el 20-mero de RX-0194, mostraron una inhibición medible de la expresión de ARNm de Akt-1.

La citotoxicidad se probó usando los mismos oligómeros que comprenden 5 ó 10 nucleótidos aguas arriba y aguas abajo de la secuencia de la que se derivó el 20-mero de RX-0194 en las líneas celulares UMRC2, MKN-45, U251 y OVCAR-3. Los 4 oligómeros modificados demostraron efectos citotóxicos comparables con el 20-mero de RX-0194, de acuerdo con los datos de RT-PCR. Las versiones truncadas de RX-0194 y RX-0201 descritas anteriormente también mostraron una fuerte inhibición de la proliferación celular de cáncer.

**Ejemplo 9: Estudio de xenoinjerto ex vivo**

Con el fin de observar la inhibición del crecimiento de diversos tumores por uno de los compuestos de RX, RX-0201, en modelos animales, se realizó un estudio de xenoinjerto *ex vivo* de ratones sin pelo. Fragmentos de treinta a cuarenta mg de un tumor humano, tal como U251, PC-3, Caki-1 y PANC-1, de un pase *in vivo* existente, se implantaron subcutáneamente (sc) en ratones próximos al área axilar derecha usando una aguja de 12 trócares de calibre. El día del implante del tumor se designó el día 0. Se dejó que los tumores alcanzaran 75-250 mm<sup>3</sup> de tamaño (un estimado de 75-250 mg de peso) antes del inicio del tratamiento con RX-0201. Se implantó un número suficiente de ratones con fragmentos de manera que los tumores se seleccionaran en un intervalo de peso tan estrecho como fuera posible para el ensayo en el día del inicio del tratamiento. Aquellos animales seleccionados con tumores en el intervalo de tamaño apropiado se asignaron a diversos grupos de tratamiento. El tiempo desde el día en el que los fragmentos de tumor se implantaron al día en el que los tumores estuvieron en el intervalo de 75-250 mg es diferente para cada tumor, así, el primer día de tratamiento será diferente para cada modelo de tumor. El oligonucleótido antisentido, RX-0201, en solución salina normal se administró por inyección en la vena de la cola cada dos días durante 3 semanas, a menos que se indique lo contrario, siguiendo la detección de una masa de tumor palpable (50-100 mm<sup>3</sup>). Los oligonucleótidos se administraron a dosis de 30 mg/kg o 60 mg/kg por inyección. Los animales de control recibieron solución salina normal sola, sin oligonucleótido. Tras el tratamiento, los ratones se observaron durante hasta 30 días más para detectar un posible recrecimiento del tumor.

Los tumores se midieron y los animales se pesaron dos veces a la semana a partir del primer día de tratamiento. El volumen de tumor se determinó por mediciones con compás calibrado y usando la fórmula para una esfera elipsoide:  $L \times W^2/2 = \text{mm}^3$  en la que L y W se refieren a las dimensiones más grande y más pequeña recogidas en cada medición. Esta fórmula también se usó para calcular el peso del tumor, asumiendo densidad unitaria (1 mm<sup>3</sup> = 1 mg).

Líneas de células cancerosas humanas adecuadas fueron aquellas que ya se habían probado para la inhibición de Akt-1, y aquellas particularmente preferidas fueron U251 de glioblastoma de cerebro, PC-3 de adenocarcinoma de próstata, Caki-1 de carcinoma renal y PANC-1 de carcinoma pancreático. La eficacia antitumoral de RX-0201 se evaluó contra xenoinjertos de tumor implantados sc en ratones sin pelo y se midieron los pesos de los tumores y la tasa de supervivencia después del tratamiento de RX-0201. Los pesos de los tumores (media  $\pm$  EEM) en cada grupo de animales se presentaron en la Fig. 8A y 8B y la tasa de supervivencia se midió en la Fig. 9A, 9B y 9C.

La Fig. 8A muestra la medición del peso del tumor como indicador de eficacia de RX-0201 contra ratones sin pelo Ncr-*nu* hembra atímicos implantados sc con xenoinjertos de glioblastoma humano U251. Todos los tratamientos se iniciaron en el día 9 después del implante, cuando los tamaños individuales de los tumores oscilaron de 75 a 221 mg. El tratamiento de RX-0201 fue bien tolerado sin muertes y no se observaron fluctuaciones de más de 1 g del peso corporal. Después del día 27, los pesos de los tumores se redujeron significativamente en los ratones tratados con RX-0201 a tratamiento de 30 mg/kg en comparación con los controles.

La Fig. 8B muestra que la eficacia del tratamiento con RX-0201 contra ratones Ncr-*nu* macho implantados sc con xenoinjertos de tumor de próstata humana PC-3. Todos los tratamientos se iniciaron en el día 11 después del implante, cuando los tamaños individuales de los tumores oscilaron de 144 a 221 mg. Después del día 25, los pesos de los tumores se redujeron significativamente en los ratones tratados con RX-0201 al nivel de 60 mg/kg en comparación con los animales de control.

5 Para evaluar la tasa de supervivencia del compuesto RX-0201, ratones NCr-*nu* hembra implantados sc xenoinjertados con tumor renal humano Caki-1 y con tumor pancreático humano PANC-1 se usaron en el estudio de modelo de tumor. Al igual que en la medición de los pesos de los tumores, se usaron ratones NCr-*nu* macho para la medición de la tasa de supervivencia en el estudio de xenoinjerto de tumor PC-3. Todos los tratamientos se iniciaron en el día 11 y 12 después del implante para PC-3 y Caki-1, respectivamente, y el día 20 después del implante para PANC-1. Como se muestra por representaciones de Kaplan-Meyer, el porcentaje de animales vivos se representó frente a los días después de la inoculación. Las Fig. 9A, 9B y 9C muestran que RX-0201 aumentó significativamente la tasa de supervivencia de los animales implantados con Caki-1 al nivel de dosis de 30 mg/kg y PC-3 y PANC-1 al nivel de dosis de 60 mg/kg.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Rexahn Corporation  
Yoon, Heejeong  
Ahn, Chang-Ho  
Mao, Lingjun  
Lee, Young Bok
- 10 <120> Uso de oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión de Akt-1  
<130> HMJ03961 EP  
<140> EP 03788412.9  
15 <141> 13-08-2003  
<150> 60/404,010  
<151> 16-08-2002
- 20 <160> 22  
<170> PatentIn versión 3.1  
<210> 1  
25 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Humano  
<400> 1  
30 agtggactgg tgggggctgg 20  
<210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
35 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido
- 40 <400> 2  
ccagcccca ccagtccact 20  
<210> 3  
<211> 20  
45 <212> DNA  
<213> Humano  
<400> 3  
50 cgccaaggag atcatgcagc 20  
<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial  
55 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido  
<400> 4  
60 gctgcatgat ctcttggcg 20  
<210> 5  
<211> 19  
<212> DNA  
65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador PCR  
  
 5 <400> 5  
 ctggacaagg acgggcaca 19  
  
 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
  
 15 <400> 6  
 ggtgggctga gcttcttc gta 23  
  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 20 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
  
 25 <400> 7  
 cccatgccat cctgcgtctg 20  
  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 30 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
  
 35 <400> 8  
 acggagtact tgcgctcag 19  
  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 <400> 9  
 45 gtgcttggg cttggccagg 20  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 <400> 10  
 55 ctgagggctg aggccacacc 20  
  
 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 65



	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
5	<400> 11 gtgccgcaaa aggtcttc	18
10	<210> 12 <211> 18 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
15	<400> 12 gcctctccat ccctcaa	18
20	<210> 13 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
25	<400> 13 agatagctgg tgacagacag	20
30	<210> 14 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
35	<400> 14 cgtggagaga tcatctgagg	20
40	<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 15 tcgaaaaggt caagtgtac	20
55	<210> 16 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
60	<400> 16 tgggtcagcg gcagcggcag	20
65	<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	

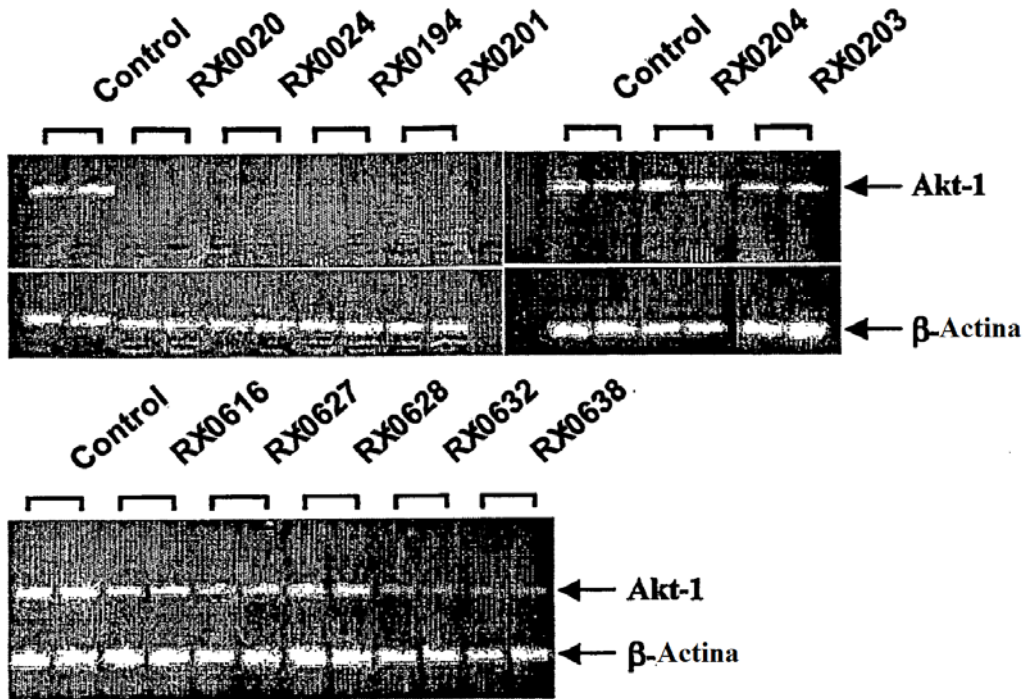
# ES 2 423 513 T3

	<220>		
	<223>	Oligonucleótido antisentido	
5	<400>	17	
		ggcgcgagcg cgggcctagc	20
	<210>	18	
	<211>	20	
10	<212>	DNA	
	<213>	Humano	
	<400>	18	
15		ctgtctgtca ccagctatct	20
	<210>	19	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Humano	
20	<400>	19	
		cctcagatga tctctccacg	20
	<210>	20	
25	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Humano	
	<400>	20	
30		gtagcacttg accttttcga	20
	<210>	21	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
35	<213>	Humano	
	<400>	21	
		ctgccgctgc cgctgcacca	20
40	<210>	22	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Humano	
45	<400>	22	
		gctaggcccg cgctcgcgcc	20

**REIVINDICACIONES**

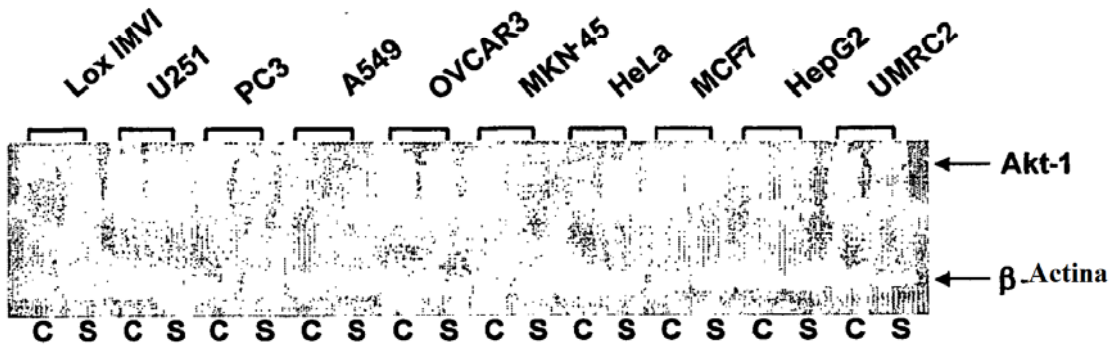
1. Un compuesto de oligonucleótido que tiene una secuencia que comprende SEC ID N° 2, N° 4, N° 16 o N° 17, elegido como diana para una molécula de ácido nucleico que codifica Akt-1 humana, en el cual el compuesto de oligonucleótido inhibe la expresión de Akt-1 humana.
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el compuesto es un oligonucleótido antisentido.
3. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene al menos un enlace internucleosídico modificado que es un enlace fosforotioato.
4. Un procedimiento para tratar células humanas o tejidos *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con el compuesto de la reivindicación 1.
- 10 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 en el cual se inhibe la expresión de Akt-1.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 en el cual se induce citotoxicidad.
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento de tratamiento médico de un ser humano o animal por terapia.
- 15 8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento de tratamiento médico de un ser humano o animal por terapia, en el cual en el procedimiento se inhibe la expresión de Akt-1.
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer.
10. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de una composición para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer en un animal o ser humano.

**Fig. 1**



**Fig. 1.** Análisis por RT-PCR de la inhibición de Akt-1 por diversos oligonucleótidos

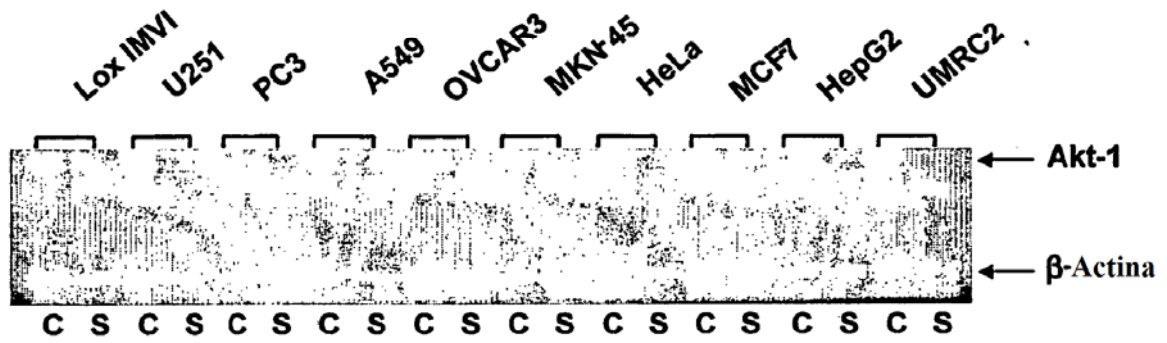
**Fig. 2**



**Fig. 2. RX-0194 inhibe la expresión de ARNm de Akt-1 en diversas líneas de células cancerosas**

**(C: control, S: RX-0194)**

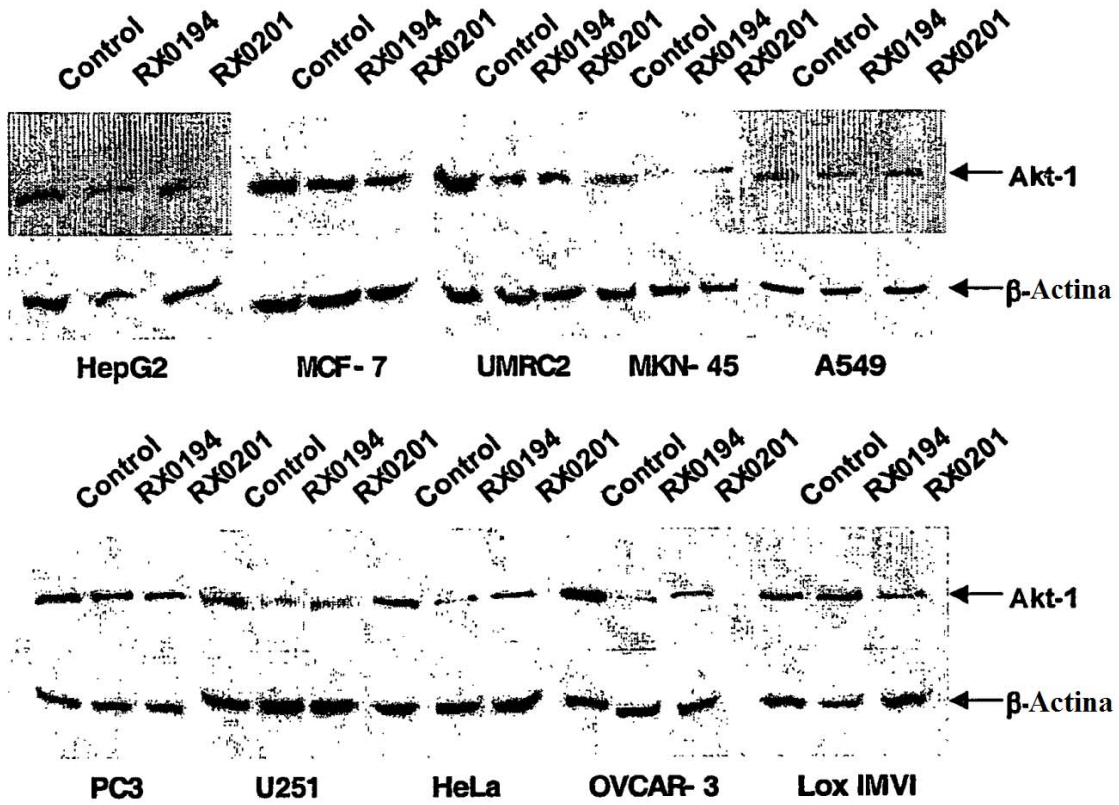
**Fig. 3**



**Fig. 3. RX-0201 inhibe la expresi3n de ARNm de Akt-1 en diversas l3neas de c3lulas cancerosas**

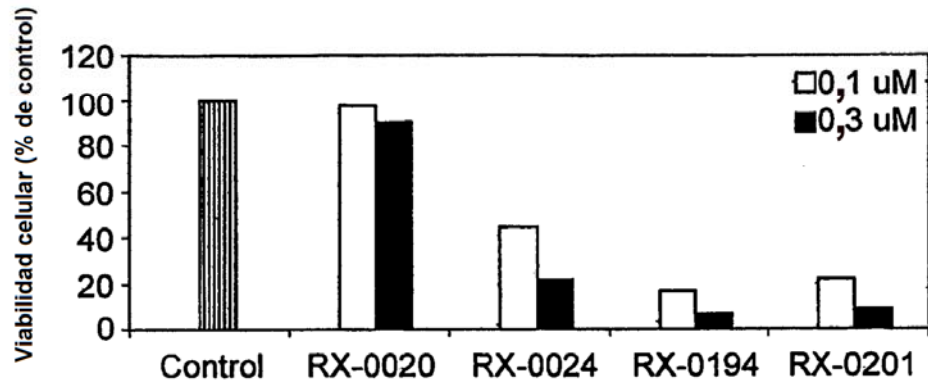
**(C: control, S: RX-0201)**

**Fig. 4**



**Fig. 4.** Análisis de transferencia Western de la inhibición de la expresión de proteína Akt-1 por RX-0194 y RX-0201

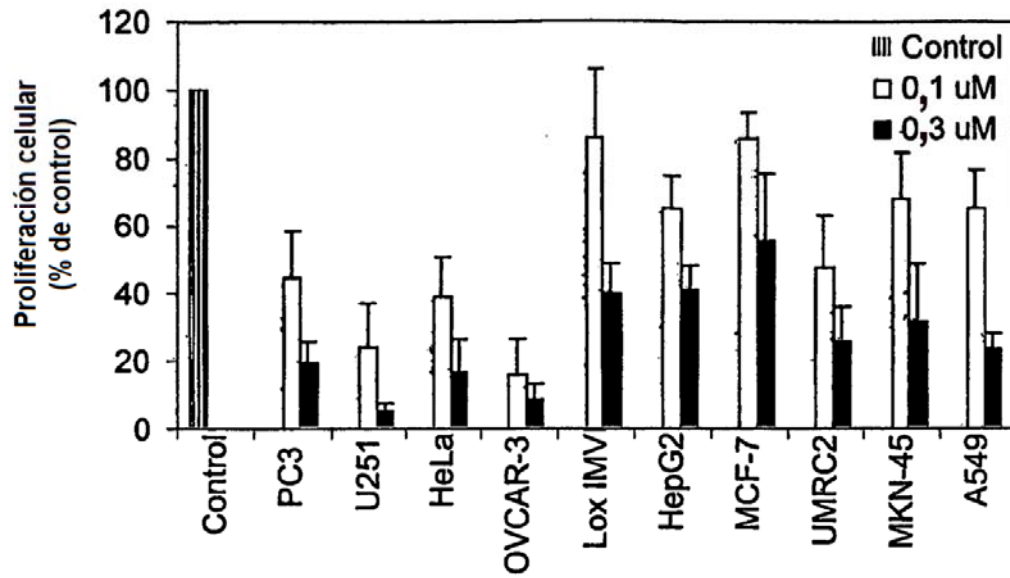
**Fig. 5**



**Fig. 5. Prueba de citotoxicidad de diversos oligonucleótidos en células UMRC2**



**Fig. 6**



**Fig. 6. RX-0194 provoca toxicidad celular en diversas células cancerosas**

Fig. 7

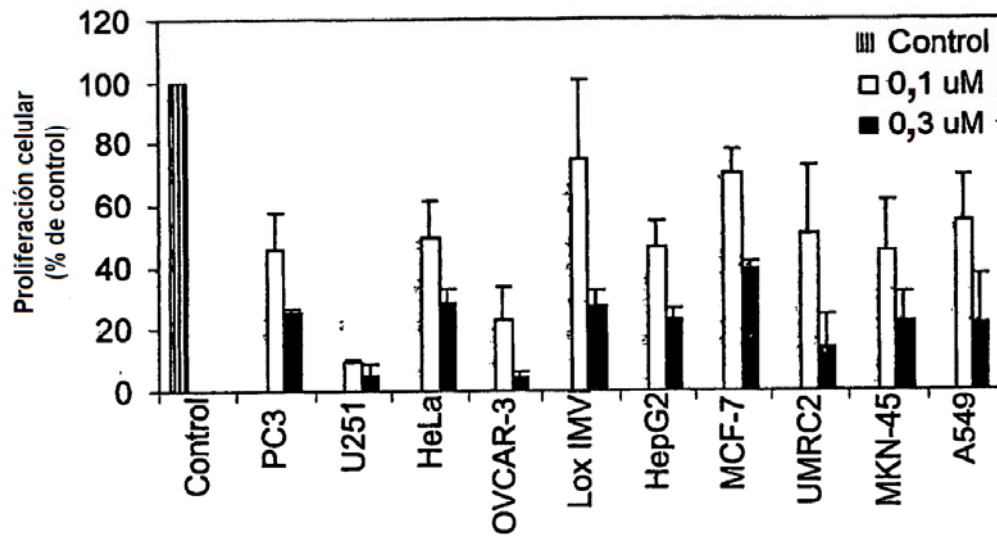
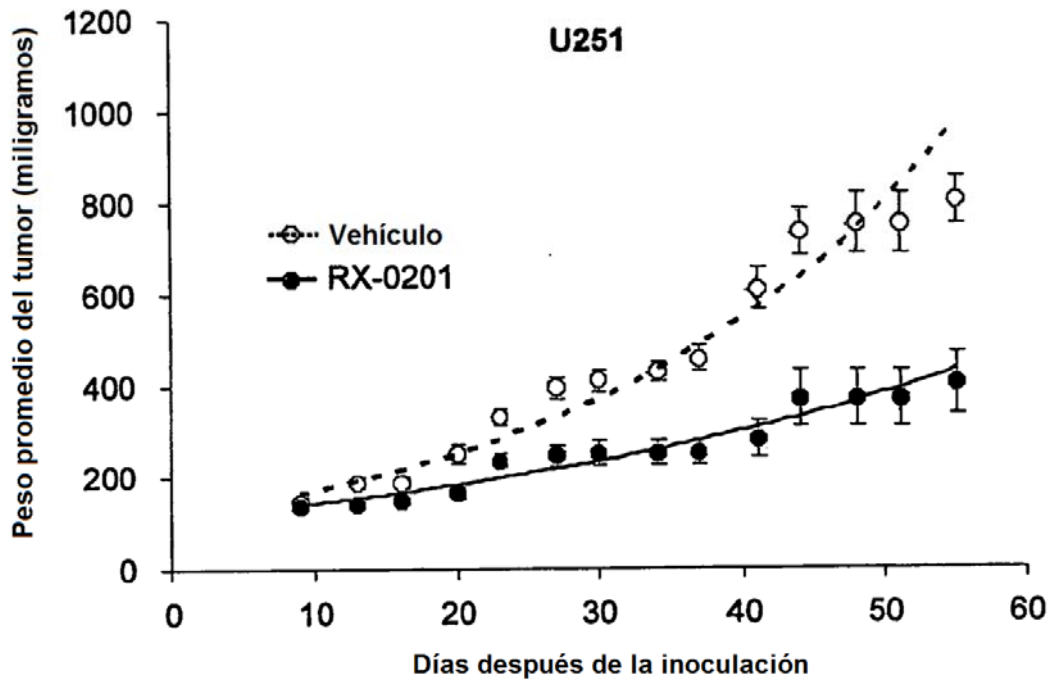


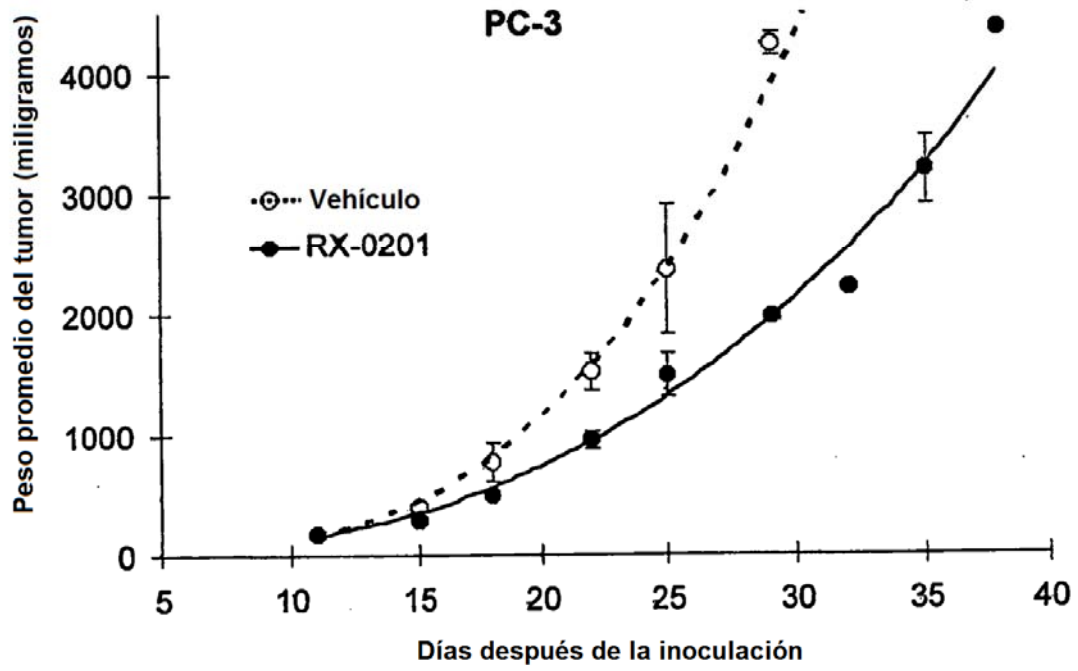
Fig. 7. RX-0201 provoca toxicidad celular en diversas células cancerosas

**Fig. 8A**



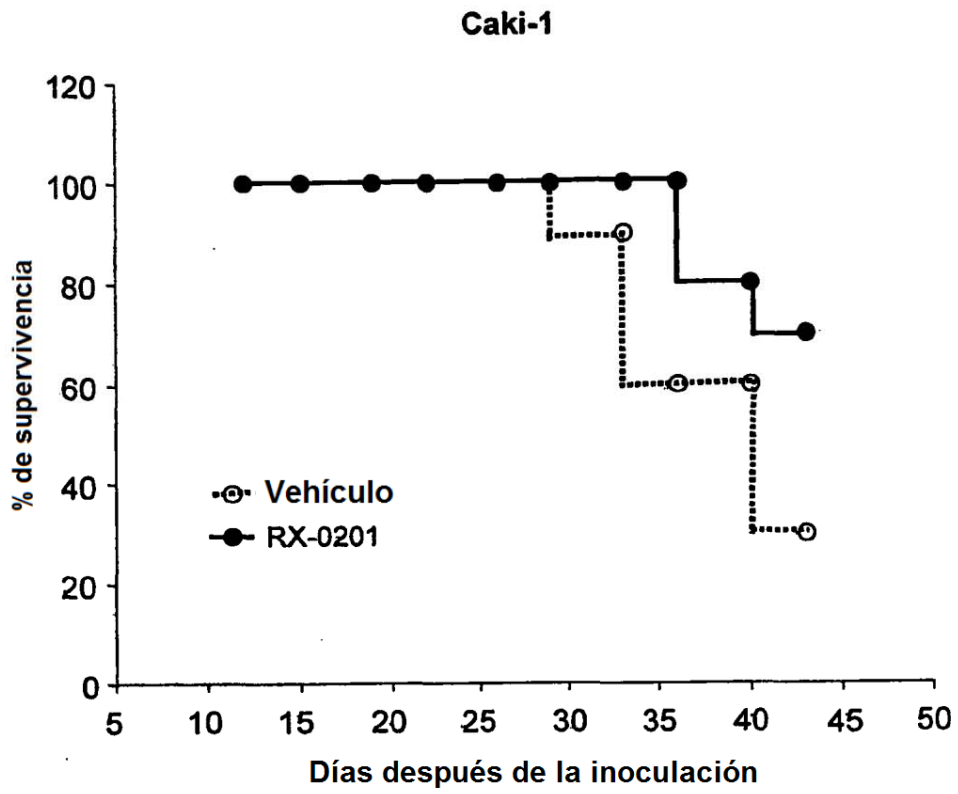
**Fig. 8A. RX-0201 provoca pérdida de peso del tumor en ratones desnudos implantados con células de glioblastoma cerebral humano U251**

**Fig. 8B**



**Fig. 8B.** RX-0201 provoca pérdida de peso del tumor en ratones desnudos implantados con células de adenocarcinoma de próstata humano PC-3

**Fig. 9A**



**Fig. 9A. RX-0201 prolonga la tasa de supervivencia al tumor en ratones desnudos implantados con células de carcinoma renal humano Caki-1**

Fig. 9B

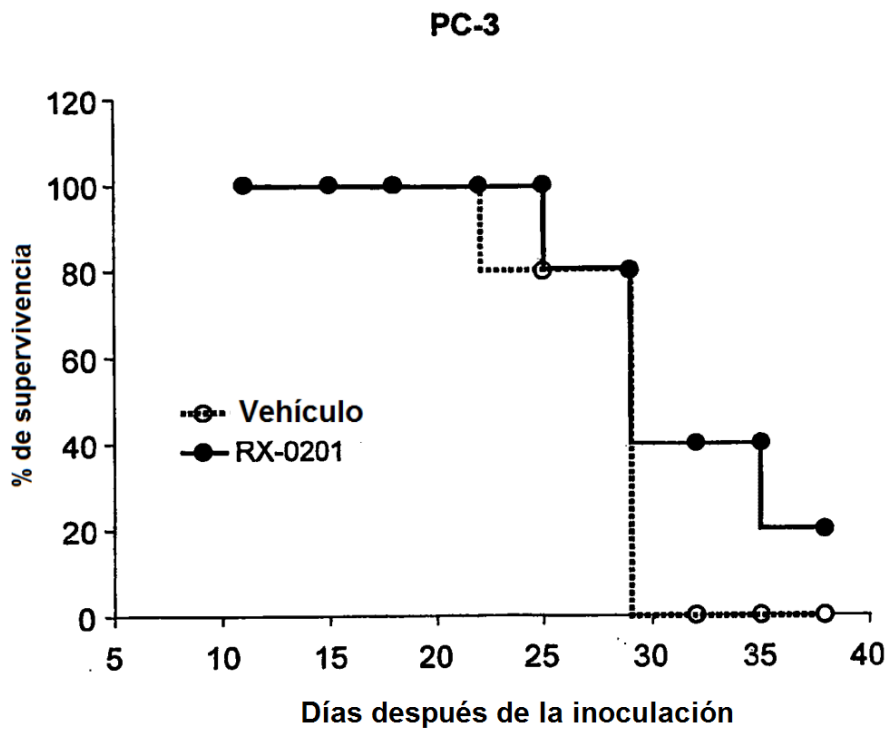
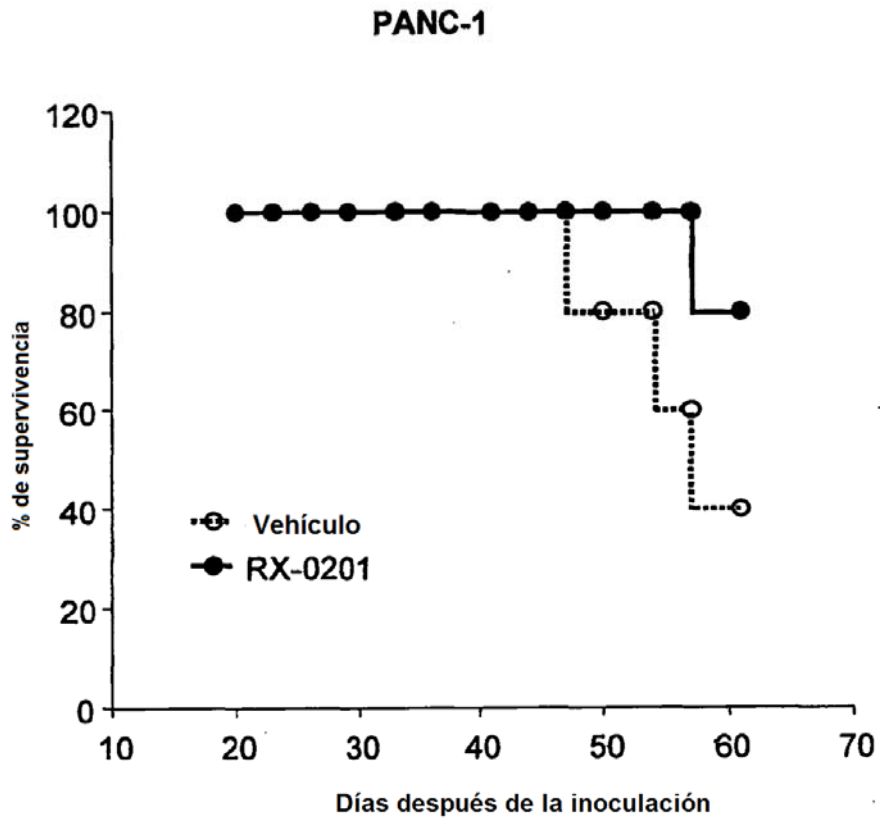


Fig. 9B. RX-0201 prolonga la tasa de supervivencia al tumor en ratones desnudos implantados con células de adenocarcinoma de próstata humano PC-3

**Fig. 9C**



**Fig. 9C. RX-0201 prolonga la tasa de supervivencia al tumor en ratones desnudos implantados con células de carcinoma pancreático humano PANC-1**