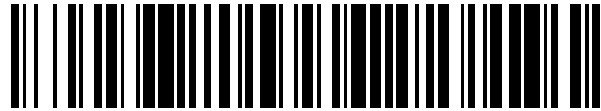


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 555**

51 Int. Cl.:

C07H 19/173 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2010 PCT/KR2010/004202**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11002200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2010 E 10794335 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2448952**

54 Título: **Nuevos oligonucleótidos modificados ricos en guanosina y actividad antiproliferativa de los mismos**

30 Prioridad:

29.06.2009 KR 20090058498
31.05.2010 KR 20100051202

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2017

73 Titular/es:

APTABIO THERAPEUTICS INC. (100.0%)
118-2 Ajou Universit Industry Cooperation
Foundation San 5 Woncheon-dong Yeongtong-gu
Suwon-si
Gyeonggi-do 443-749, KR

72 Inventor/es:

LEE, SOO JIN y
MOON, SUNG HWAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 598 555 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

Nuevos oligonucleótidos modificados ricos en guanósina y actividad antiproliferativa de los mismos

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a un oligonucleótido modificado que comprende al menos una molécula de guanósina y ácido nucleico modificado con eficacias terapéuticas según está definido en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer que comprende el ácido nucleico modificado o su sal farmacéuticamente aceptable como un ingrediente activo.

Antecedentes de la técnica

10 Incluso con el reciente y rápido progreso de la tecnología y tratamiento médicos, el cáncer todavía está considerada una de las enfermedades más mortales del mundo. Además, la tendencia global de envejecimiento de la sociedad simplemente acelera el incremento anual del número de pacientes con cáncer. En general, los agentes contra el cáncer son extremadamente tóxicos y no son capaces de retirar selectivamente las células cancerosas. Así pues, se lleva necesitando desde hace mucho el desarrollo de un agente contra el cáncer que sea muy eficaz, pero que sea menos tóxico.

15 Desde el desarrollo de la síntesis automatizada de ADN en los años ochenta del siglo XX, la investigación en el campo médico se ha dirigido más activamente al desarrollo de agentes terapéuticos mediante el uso de siRNA y antisentidos que actúan selectivamente sobre ARNm intracelular, aptámeros, CpG y cebos que actúan selectivamente sobre ribozimas y proteínas, etc. [Gleave et al., *Nat Rev Cancer*. 2005, 468-479; Castanotto et al., *Nature* 2008, 426-433; Sullenger et al., *Nature*, 2002, 252-258; Kaur et al., *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 2008, 43-60; 20 Jurk M et al., *BioDrugs*. 2007, 387-401; Tomita et al., *Clin Exp. Nephrol*. 2007, 7-17].

Se sabe que los oligonucleótidos ricos en guanósina tienen actividad inhibidora del crecimiento frente a un amplio espectro de células cancerosas. Cuando las células cancerosas se tratan con oligonucleótidos ricos en guanósina, se fijan a proteínas concretas en las células, por ejemplo, eEF1A, JNK, Ki-ras, nucleolina, stat3, telomerasa, topoisomerasa, que están asociadas muy estrechamente al crecimiento y muerte celulares, y que regulan el ciclo 25 celular. Se sabe que estas proteínas se expresan a mayor nivel en las células cancerosas que en células normales [Christopher R. Ireson et al., *Molecular Cancer Therapy* 2006, 2957-2962; Naijie Jing et al., *Cancer Research*, 2004, 6603-6609; Christophe Marchand et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 8906-8911].

Estos oligonucleótidos ricos en guanósina tienen una estructura especial que incluye tres puentes de hidrógeno con la citosina. Pueden tener una estructura tetracatenaria gracias a fijaciones intramoleculares o intermoleculares. En 30 vez de formar una estructura de doble hélice mediante puentes de hidrógeno entre la adenosina y la timidina, y la guanósina y la citidina, cuatro moléculas de guanósina quedan localizadas en el mismo plano para formar puentes de hidrógeno de tipo Hoogsteen, gracias a lo cual se forma un cuarteto de G. Este cuarteto de G se repite al menos una vez y forma una estructura tetrahelicoidal.

En general, los oligonucleótidos no se han visto favorecidos en el desarrollo de nuevos fármacos debido a su poca 35 estabilidad en la sangre y a su poca permeabilidad celular. Sin embargo, se sabe que los oligonucleótidos con la estructura de cuartetos de G tienen una estructura estable, y una estabilidad en la sangre y permeabilidad celular relativamente altas [Julian Leon Huppert, *Chemical Society Reviews* 2008, 37, 1375-1384; Paula J. Bates et al., *Experimental and Molecular Pathology* (2009) 151-164; Christopher R. Ireson et al., *Molecular Cancer Therapy* 2006, 2957-2962]. La patente de los EE. UU. n.º 7.312.082 enseña que la estabilidad del cuarteto de G depende de los 40 cationes monovalentes, de los agentes intercalantes y de la concentración de oligonucleótidos o similares (Haiyan Qi et al., *Cancer Res*. 2006, 118808-11816, Anna Arola et al., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, 1405-1415).

La patente de los EE. UU. n.º 7.314.926 y la publicación de la solicitud de la patente de los EE. UU. n.º 2007-105805 describen que a los cuartetos de G se fijan determinadas proteínas, las cuales se expresan en la superficie de las 45 células cancerosas, entran en las células cancerosas por endocitosis y se fijan a proteínas que intervienen en la apoptosis celular, por medio de lo cual se inhibe el crecimiento de las células cancerosas. Se sabe que la apoptosis celular está inducida por el efecto citostático en lugar de por el efecto citotóxico [Paula J. Bates et al. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 26369-26377; Bruna et al., *FEBS* 2006, 1350-1361].

Además de su efecto inhibidor sobre el crecimiento de las células cancerosas, también se conocen otros efectos de 50 los oligonucleótidos que forman cuartetos de G. Por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 5.567.604 describe un efecto antiviral; la patente de los EE. UU. n.º 6.994.959 describe el efecto sobre la regulación inmunitaria; y la publicación de la solicitud de la patente de los EE. UU. n.º 2007-105805 describe su función para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, lo que sugiere que están asociadas a diversas funciones biológicas y regulaciones del organismo [Cheryl A. Stoddart et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998, 2113-2115; Michael Skogen et al. *BMC Neuroscience*, 2006, 7:65]. Muchas líneas de investigación se han centrado en utilizar oligonucleótidos que 55 forman cuartetos de G para el tratamiento de diversas enfermedades y, recientemente, se ha realizado un estudio clínico para comprobar su posible uso como agente contra el cáncer [Paula J. Bates et al., *Experimental and Molecular Pathology* (2009) 151-164].

El AS-1411, un fármaco clínico desarrollado como resultado de las investigaciones, es un oligonucleótido que forma cuartetos de G, el cual se fija a la nucleolina que se sobreexpresa en células cancerosas, con lo que ejerce una actividad inhibitoria excelente contra el crecimiento de las células cancerosas. Además, consigue reducir de forma considerable su influencia sobre las células normales del organismo a la vez que incrementa su acción apoptótica celular contra las células cancerosas, con lo que se espera, por lo tanto, que pueda llegar a convertirse en un nuevo fármaco contra el cáncer [Christopher R. Ireson et al., *Mol Cancer Ther.* Diciembre de 2006; 5(12): 2957-62]. Los oligonucleótidos formadores de cuartetos de G inducen la apoptosis celular mediante la inhibición del crecimiento celular. No obstante, existe la desventaja con los oligonucleótidos que forman cuartetos de G de que es esencial proporcionarles a un paciente una inyección de Ringer al día durante un periodo de 4 a 7 días debido a que su citotoxicidad es relativamente baja, y también hay una carga por la necesidad de la administración combinatoria de un quimioterápico que es muy tóxico [Paula J. Bates et al. *Experimental and Molecular Pathology* (2009) 151-164; Christopher R. Ireson et al., *Molecular Cancer Therapy*, 2006, 2957-2962].

Para solucionar los problemas anteriores, los inventores de la presente invención han hecho esfuerzos por mejorar el efecto apoptótico celular de los oligonucleótidos formadores de cuartetos de G mediante la introducción de un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz que tiene efectos apoptóticos sobre los oligonucleótidos formadores de cuartetos de G.

Un ejemplo representativo de ácidos nucleicos modificados y terapéuticamente eficaces es el 5-fluorouracilo (5-FU). El 5-FU se desarrolló primero a finales de los años cincuenta como un agente antineoplásico y antimetabólico. Se sabe que su actividad contra el cáncer se ejerce mediante el bloqueo de la timidilato sintasa [Piedo et al., *J. Clin. Oncol.* 1988, 1953-1664]. Además, los profármacos en forma de un nucleósido de 5-fluoropirimidina, tal como la 5-fluorodesoxiuridina (5-FdU), la 5-fluorodesoxicidina (5-FdC) y la 5-fluorouridina se ha utilizado para el tratamiento del cáncer colorrectal, el cáncer de mama y el cáncer de cabeza y cuello durante más de 4 décadas, y se están estudiando en un ensayo clínico [Thomas et al. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998, 887-895; Heidelberger et al. *Nature* 1957 179: 663-666; Longley et al., *Nat. Rev. Cancer* 2003, 330-338; Beumer et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008, 363-368; Song et al. *Clinical Cancer Research*, 1997, 901-909]. Ya que se saben sintetizar las preparaciones de fosforamida, que comprenden en los oligonucleótidos estas 5-fluorodesoxiuridina, 5-fluorodesoxicidina o nucleósido de 5-fluorouridina, fue posible sintetizar en un sintetizador de ADN en fase sólida los oligonucleótidos que contienen los nucleósidos terapéuticos [Gmeiner et al., *J. Org. Chem.* 1994, 5779-5783; Schmidt et al., *Nucleic Acids Research*, 1992, 2421-2426; Stolarski et al., *Biochemistry* 1992, 31, 7027-7042].

Estos oligonucleótidos que contienen los nucleósidos terapéuticos liberan la 5-FdU y la 5-FdC durante la degradación enzimática por la acción de las exonucleasas, y se acaban asociando a diferentes clases de enzimas para convertirse en 5-FdUMP como una forma completamente activada, gracias a lo cual se induce la apoptosis celular. Así pues, se sabe que los oligonucleótidos obtenidos son más citotóxicos que el 5-FdU a la misma concentración y también son más eficaces desde el punto de vista terapéutico a la hora de tratar las células cancerosas resistentes a los fármacos [Gmeiner et al., *Nucl. Nucl.* 1995, 243-253].

En la patente de los EE. UU. n.º 5.457.187 se describe la citotoxicidad de un oligonucleótido de homo-poli-FdU que contiene 5-fluorouracilo, y la patente de los EE. UU. n.º 5.614.505 describe la citotoxicidad de los oligonucleótidos que comprenden FdU. Sin embargo, estos oligonucleótidos que contienen 5-fluorouracilo no forman cuartetos de G, tienen muy poca estabilidad en la sangre y son poco permeables para la célula, con lo que no resultan idóneos para que sean desarrollados como fármaco con respecto a su estructura y eficacia farmacéutica.

Compendio de la invención

Casos a resolver

Los inventores de la presente invención, en un intento por solucionar los problemas descritos más arriba asociados a la técnica anterior, descubrieron que al introducir al menos un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz, que es capaz de inducir la apoptosis celular debido al efecto citotóxico, en los oligonucleótidos, que forman un cuarteto de G debido a la presencia de muchas guanosinas con efecto citotóxico, la estabilidad en la sangre y la permeabilidad celular del oligonucleótido se consideró que habían mejorado considerablemente, mientras que el crecimiento de las células cancerosas resultó inhibido con más eficacia, lo que al final condujo a la apoptosis. Tras la comparación del efecto citotóxico de los oligonucleótidos mencionados más arriba sintetizados del mismo, se confirmó que su efecto citotóxico contra las células cancerosas era superior al de un fármaco clínico.

Así pues, la presente invención se refiere a un nuevo oligonucleótido modificado y rico en guanosinas que contiene un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Además, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y tratar el cáncer que comprende como ingrediente activo el oligonucleótido modificado anteriormente mencionado o su sal farmacéuticamente aceptable.

Solución técnica

La presente invención se refiere a un oligonucleótido modificado que se indica mediante una secuencia de

nucleótidos 'GxHyNz', en donde la G se selecciona del grupo que consiste en 2-desoxiguanosina, guanosina, 2'-O-metilguanosina, 2'-F-guanosina, LNA (ácido nucleico bloqueado)-guanosina, D-desoxiguanosina y D-guanosina; H es un ácido nucleico exclusivo de guanosina; N es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en 5-fluorodesoxicitidina, 5-fluorocitidina, 5-yododesoxicitidina, 5-yodocitidina, arabinósido de citosina/Ara-C, 2',2'-difluorodesoxicitidina/gemcitabina y capecitabina, en donde G, H y N se distribuyen al azar; x es un entero de 1 a 30, y es un entero de 0 a 30, z es un entero de 1 a 30, en donde la suma de (x + y + z) no es mayor de 60, en donde el oligonucleótido modificado se selecciona de las SEQ ID n.^{os} 1, 2, 3, 4, 6, 7, 13, 18, 23, 24, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47.

Además, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y tratar el cáncer, que comprende como un ingrediente activo el oligonucleótido modificado mencionado más arriba o su sal farmacéuticamente aceptable.

Efecto de la invención

El oligonucleótido modificado de la presente invención es un compuesto con una nueva estructura química que comprende al menos un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz, y guanosina capaz de formar una estructura de cuarteto de G. Tiene una excelente actividad apoptótica celular y, así pues, es idónea como agente terapéutico para prevenir y tratar el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Lo anterior y otras peculiaridades de la presente invención se describirán a continuación en detalle con referencia a determinadas realizaciones de ejemplo, las cuales se ilustrarán con los dibujos acompañantes que se ofrecen a continuación únicamente a modo de ilustración y, así pues, no son limitantes de la presente invención, y en donde:

En la figura 1 se muestra una guanosina o sus derivados;

En la figura 2 se muestra el nivel de la inhibición del crecimiento celular debida a diferentes oligonucleótidos modificados, sin estar conformes a la invención;

En la figura 3 se muestran imágenes de la Cl_{50} de los oligonucleótidos modificados sin estar conformes a la invención y su morfología celular;

La figura 4 es una gráfica que compara la actividad de apoptosis celular de diferentes oligonucleótidos modificados frente a las células de LMC (leucemia mielógena crónica) K562 (porcentaje de crecimiento celular, en 1 μ M);

La figura 5 es una gráfica que compara la actividad de apoptosis celular de diferentes oligonucleótidos modificados frente a las las células de LMA (leucemia mielógena aguda) MV-4-11 (porcentaje de crecimiento celular, en 2 μ M);

En la figura 6 se presenta una gráfica que muestra el resultado del análisis de dicroísmo circular (DC) para confirmar la presencia de la estructura de cuarteto de G en el oligonucleótido APT-4001, un control positivo;

En la figura 7 se presenta un gráfico que muestra el resultado del análisis de dicroísmo circular (DC) para confirmar la presencia de la estructura de cuarteto de G en el oligonucleótido APT-2054 preparado en el ejemplo 1; y

En la figura 8 se presenta un gráfico que muestra el resultado del análisis de dicroísmo circular (DC) para confirmar la presencia de la estructura de cuarteto de G en el oligonucleótido APT-2073 preparado en el ejemplo 1.

Mejor modo de realizar la invención

La presente invención se describe con más detalle según se presenta aquí en virtud de esto.

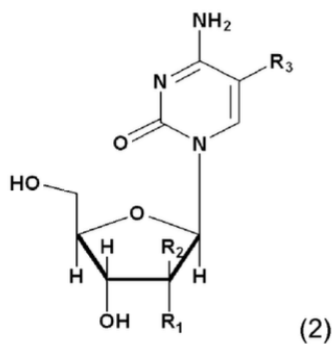
Se describe en la presente memoria un oligonucleótido preparado de tal manera que un nucleótido rico en guanosinas, que es capaz de formar una estructura de cuarteto de G, se introduce con un ácido nucleico modificado para conferirle citotoxicidad.

El cuarteto de G utilizado en la presente invención es rico en al menos una guanosina (G) representativa seleccionada del grupo que consiste en 2-desoxiguanosina, guanosina, 2'-O-metilguanosina, 2'-F-guanosina, LNA (ácido nucleico bloqueado)-guanosina, D-desoxiguanosina y D-guanosina (figura 1). En un oligonucleótido con cuarteto de G, las cuatro moléculas de guanosina están localizadas en el mismo plano para formar puentes de hidrógeno de tipo Hoogsten, gracias a lo cual se forma una estructura helicoidal cuádruple, y a este oligonucleótido se le introduce en la presente invención un ácido nucleico modificado con eficacia terapéutica.

El oligonucleótido rico en guanosinas que forma una estructura de cuarteto de G se sabe que se fija selectivamente a las células cancerosas y también que inhibe el crecimiento de las células cancerosas por diferentes mecanismos. Cuando el oligonucleótido que forma la estructura de cuarteto de G se introduce con al menos un ácido nucleico modificado y a continuación se transporta al interior de las células cancerosas, el efecto inhibitor del crecimiento celular debido a la propia estructura de cuarteto de G y el efecto inhibitor directo del crecimiento celular debido al

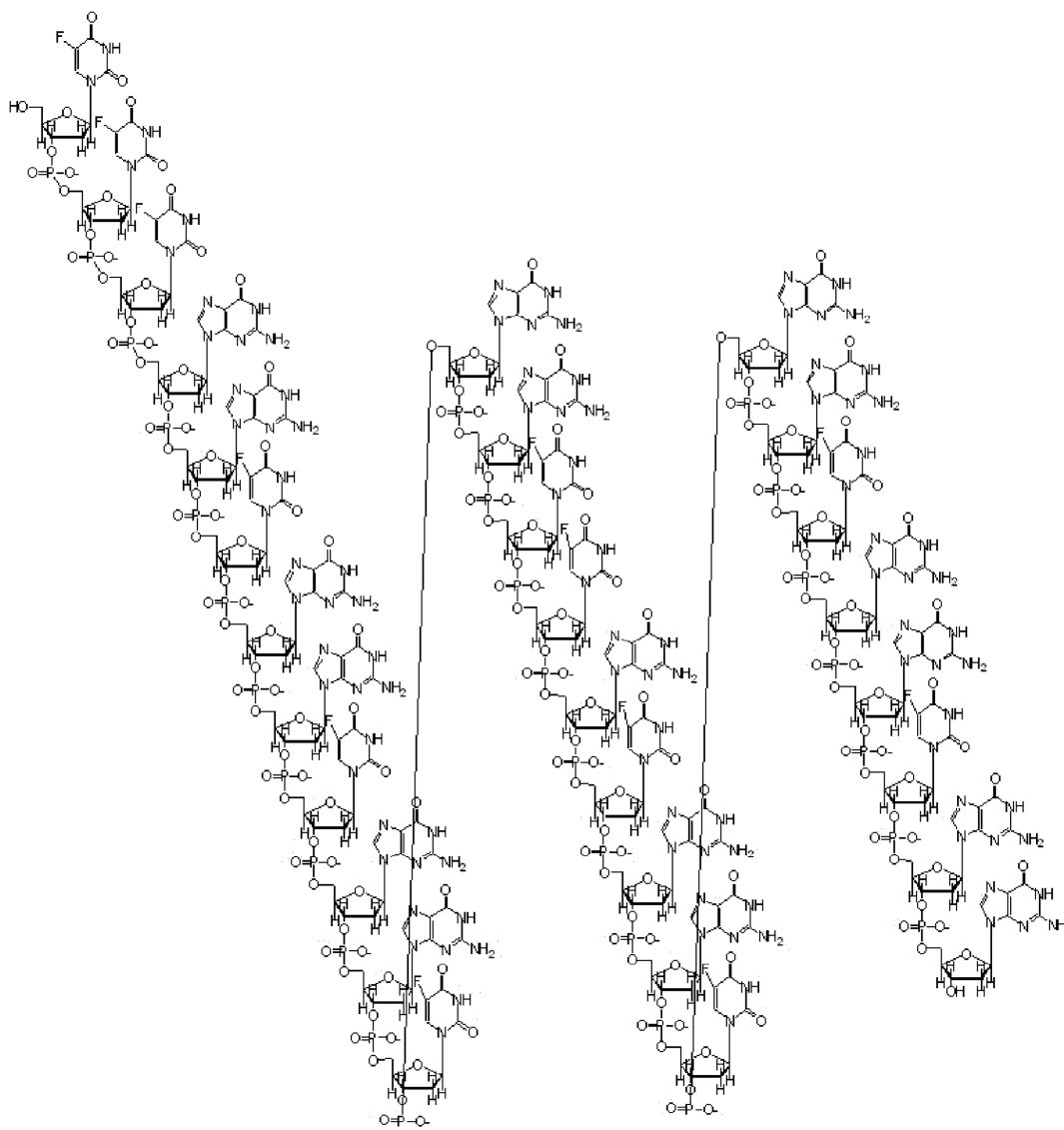
ácido nucleico modificado, al que se da un efecto terapéutico cuando queda degradado por la acción de una nucleasa, trabajan juntos para finalmente conducir a la muerte de las células cancerosas. El oligonucleótido que forma la estructura de cuarteto de G por sí solo únicamente puede ejercer el efecto inhibitor del crecimiento celular y, así pues, no tiene un efecto apoptótico celular alto, por lo que requiere un tratamiento largo y continuo durante un periodo de tiempo determinado. Sin embargo, la adición de un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz en el oligonucleótido que forma la estructura de cuarteto de G de la presente invención confirmó que se había mejorado considerablemente el efecto apoptótico, gracias a lo cual se incrementa considerablemente la tasa de apoptosis celular.

- En general, los ejemplos de ácidos nucleicos terapéuticamente eficaces son adenosina, guanosina, timidina, citidina y uridina, en donde su azúcar o su base está modificada. Más específicamente, los ácidos nucleicos modificados derivados de la uridina o de la citidina utilizados en la presente invención son los nucleósidos de tipo pirimidina, tal como la citidina de la fórmula 2 que viene a continuación. Estos nucleósidos se pueden convertir en fosforamidita mediante el uso de un método convencional [*Oligonucleótidos and Analogues: A Practical Approach*, 1991, Fritz Eckstein et al. IRL Press: Oxford]; o la fosforamidita nucleotídica se puede comprar a las casas comerciales (p. ej., Glenresearch, Berry and Associates, Okeanos Tech, Chemgene, Prologo) y, a continuación, se puede introducir en un oligonucleótido rico en guanosina mediante la síntesis en fase sólida con un sintetizador de ADN de acuerdo con un método conocido.



- En la fórmula 1 o 2 anteriores, R_1 es un hidrógeno, un halógeno o un grupo hidroxilo, R_2 es un hidrógeno, un halógeno o un grupo hidroxilo, R_3 es un hidrógeno, un halógeno, alquilo (C_{1-10}), haloalquilo (C_{1-10}), alqueno (C_{2-10}), haloalqueno (C_{2-10}), en donde R_1 y R_2 no son un grupo hidroxilo al mismo tiempo.

- Los ácidos nucleicos modificados de más arriba derivados de la citidina (N) de acuerdo con la invención son 5-fluorodesoxicitidina, 5-fluorocitidina, 5-yododesoxicitidina, 5-yodocitidina, arabinósido de citosina/Ara-C, 2',2'-difluorodesoxicitidina/gemcitabina y capecitabina. Los ácidos nucleicos modificados anteriores se convierten primero en la forma de fosforamidita y a continuación se preparan en un oligonucleótido modificado a través de la síntesis en fase sólida con un sintetizador de ADN de acuerdo con un método conocido. Es decir, el oligonucleótido modificado se sintetiza por disolución de la fosforamidita del ácido nucleico modificado anterior en acetonitrilo anhidro y cargándolo en un sintetizador de ADN de acuerdo con el protocolo proporcionado por Glenresearch Corporation o la síntesis y métodos de purificación convencionales descritos en las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.457.187 y 5.614.505. Un ejemplo de un oligonucleótido modificado sintetizado así (sin estar conforme a la invención) se muestra a continuación en la fórmula 3.



(3)

- Además, los ejemplos de las secuencias de oligonucleótidos modificados que se pueden sintetizar con el uso de ácidos nucleicos modificados, con respecto a las secuencias oligonucleotídicas ya descritas con el propósito del tratamiento terapéutico [Paula J. Bates et al., *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 26369-26377, Cheryl A Stoddart et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998, 2113-2115, Vrina Dapic et al. *Biochemistry* 2002, 3676-3685, Najjie Jing et al., *Biochemistry* 2002, 41, 5397-5403, Najjie Jing et al., *Cancer Research* 2004, 6603-6609, Haiyan Qi et al., *Cancer Resarch* 2006, 11808-11816, YunTeng et al. *Cancer Research* 2007, 10491-10500, Bruna Scaggiante et al., *FEBS Journal* 2006, 1350-1361, Julie E. Reed et al., *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 5992-5993, Jeffrey S. Bishop et al., *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 5698-5703, Christophe Marchand et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 8906-8911, Jun-ichiro Suzuki et al., *Journal of Virology* 2002, 3015-3022, Vrina Dapic et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, 2097-2107, Amber Goodchild et al. *Nucleic Acid Research* 2007, 4562-4572, patentes de los EE. UU. n.ºs 6.323.185, 7.314.926, 6.994.959, 7.157.436 y 7.199.228] o a diferentes secuencias oligonucleotídicas con la estructura de cuarteto en G que muestran actividades fisiológicas, al introducir al menos un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, en el caso de las secuencias oligonucleotídicas que se sabe que muestran actividad de inhibición del crecimiento celular, tales como TTTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG o GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG, se pueden sintetizar en general diferentes oligonucleótidos modificados mediante la introducción de al menos un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz, por ejemplo, 5-FdU ('F' de aquí en adelante) o 2',2'-difluorodesoxicidina/gemcitabina (Gemcitabina, 'Z' de aquí en adelante). Más específicamente, mediante la introducción de un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz en una posición idónea de cualquiera de los oligonucleótidos que tienen las secuencias anteriores, que incluyen

FFFGGFGGFGGFGGFFFGFGGFGGFGGFGG, FFFGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG,
 GGFGGFGGFGGFFFGGFGGFGGFGGFGG,
 GGFGGFGGFGGTTGTGGFGGFGGFGG,
 GGFGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGFG,
 GGTGGTGGTGGFFFGGTTGGTGGTGGTGG,
 GGTGGTGGTGGTTZTGGTGGTGGTGG,
 GGTGGTGGTGGTZGTGGTGGTGGTGG,
 GGZGGZGGZGGZGGZGGZGGZGGZGG, y
 GGTGGTGGTGGTZGTGGTGGTGGTGG, GGZGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGZGG,

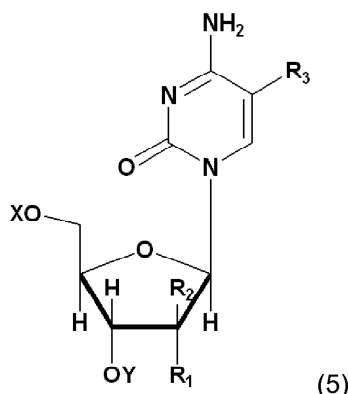
GGTGGZGGTGGTTGTGGTGGZGGTGG, se pueden sintetizar diferentes nucleótidos modificados. También se ha demostrado que estas secuencias tienen una excelente actividad apoptósica celular.

- 5 Se pueden obtener nuevos oligonucleótidos modificados mediante la introducción de un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz en una posición idónea de cualquiera de los oligonucleótidos que se describieron para el propósito del tratamiento terapéutico o de los oligonucleótidos con estructura de cuarteto de G que tienen actividades fisiológicas.
- 10 Las secuencias de los nuevos oligonucleótidos modificados y la posición para la introducción de los ácidos nucleicos modificados podrían influir en la afinidad o en la especificidad para actuar selectivamente sobre regiones con cuartetos de G que tienen proteínas. Por lo tanto, las secuencias de los nuevos oligonucleótidos y la posición para introducir ácidos nucleicos modificados se podrían determinar mediante la afinidad o la especificidad para actuar selectivamente sobre regiones con cuartetos de G que tienen proteínas. Los oligonucleótidos modificados de acuerdo con la presente invención se podrían determinar mediante actividades fisiológicas que se muestran
- 15 mediante factores decisivos, tales como la afinidad de fijación o la especificidad para actuar selectivamente sobre regiones con cuartetos de G que tienen proteínas.

Las secuencias de los nuevos oligonucleótidos modificados por el método anterior son tal y como se presenta a continuación.

- 20 En la presente memoria se describe una secuencia oligonucleotídica llamada 'G_xH_yN_z', en donde G se selecciona del grupo que consiste en 2-desoxiguanosina, guanosina, 2'-O-metilguanosina, 2'-F-guanosina, LNA (ácido nucleico bloqueado)-guanosina, D-desoxiguanosina y D-guanosina; H es un ácido nucleico exclusivo de la guanosina; N es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en 5-fluorodesoxicitidina, 5-fluorocitidina, 5-yododesoxicitidina, 5-yodocitidina, arabinósido de citosina/Ara-C, 2',2'-difluorodesoxicitidina/gemcitabina y capecitabina, en donde G, H, N se distribuyen aleatoriamente; x es un entero de 1 a 30, y es un entero de 0 a 30, z es un entero de 1 a 30, en donde
- 25 la suma de (x + y + z) no es mayor de 60.

El ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz anterior (N) está representado por la fórmula 5 y reside en los oligonucleótidos modificados.



- 30 En la fórmula 5 anterior, R₁ es un hidrógeno, un halógeno o un grupo hidroxilo, R₂ es un hidrógeno, un halógeno o un grupo hidroxilo, R₃ es un hidrógeno, un halógeno, alquilo(C₁₋₁₀), haloalquilo(C₁₋₁₀), alqueno(C₂₋₁₀), haloalqueno(C₂₋₁₀), en donde R₁ y R₂ no son un grupo hidroxilo al mismo tiempo, X e Y son respectivamente un hidrógeno, o un átomo de fósforo en el grupo fosfato del ácido nucleico adjunto.

La H anterior es más preferiblemente adenosina, citidina, uridina o timidina, en donde la suma de (x + y + z) no es mayor de 60, preferiblemente está en el intervalo de 5 a 60, lo más preferiblemente de 14 a 26.

Los agentes convencionales que comprenden un nucleósido terapéuticamente eficaz se sabe que a menudo provocan efectos secundarios, tales como la toxicidad sistémica y la resistencia a fármacos. Además, se sabe que muchas células cancerosas son resistentes a estos agentes contra el cáncer que contienen un nucleósido terapéuticamente eficaz, lo que requiere la selección de otras clases de fármacos en su lugar. En el caso de que estos nucleósidos terapéuticamente eficaces estén contenidos en un oligonucleótido con una estructura de cuarteto de G, que tiende a actuar más selectivamente sobre las células cancerosas, disminuirá al mínimo su influencia sobre las células normales del organismo, y también incrementará su tasa de apoptosis celular contra los cánceres farmacorresistentes.

El oligonucleótido modificado que se menciona más arriba, como es el caso del oligonucleótido con estructura de cuarteto de G, ha mostrado un pico mínimo a aproximadamente 240 nm, y el pico máximo a aproximadamente 260-270 nm según el análisis por difracción circular (DC). Estos rasgos característicos respaldan que el oligonucleótido modificado de la presente invención tiene la estructura de cuarteto de G, y se ha descrito información relevante (M. Lu, Q. Guo, N. R. Kallenback, *Biochemistry*, 1992, 31, 2455; P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20, 4061; *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 91, 1994, 7658-7662; *Biochemistry*, 1997, 36, 12498; *Biochemistry*, 2002, 41, 3676).

La estructura de cuarteto de G se vuelve más estable en presencia de iones de potasio (K^+). Conserva una estructura estable en una condición fisiológica dada, tal como en la sangre, durante un periodo relativamente largo de tiempo. Por lo tanto, en la presente invención, el oligonucleótido con estructura de cuarteto de G que comprende un ácido nucleico modificado y terapéuticamente eficaz se estabiliza antes de usarlo al tratarlo con una solución de KCl (30-70 mM). El nuevo oligonucleótido modificado de acuerdo con la presente invención mostró que tiene un efecto apoptótico superior sobre las células cancerosas que el fármaco clínico.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y tratar el cáncer que comprende el oligonucleótido modificado de más arriba, o su sal farmacéuticamente aceptable, como un ingrediente activo.

Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen un sal de metal, una sal con una base orgánica, una sal con un ácido inorgánico, una sal con un ácido orgánico, una sal con un aminoácido ácido o básico, o similares.

Los ejemplos de la sal de metal idónea incluyen una sal de metal alcalino, tal como sal de sodio y sal de potasio; sal de un metal alcalinotérreo, tal como sal de calcio, sal de magnesio y sal de bario; sal de aluminio, o similares.

Los ejemplos de la sal idónea con una base orgánica incluyen una sal con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, 2,6-lutidina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ciclohexilamina, dicitlohexilamina, *N,N*-dibenciletilenammina, o similares.

Los ejemplos de la sal idónea con un ácido inorgánico incluyen una sal con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o similares.

Los ejemplos de la sal idónea con un ácido orgánico incluyen una sal con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, o similares.

Los ejemplos de la sal idónea con aminoácido básico incluyen una sal con arginina, lisina, ornitina o similares.

Los ejemplos de la sal idónea con aminoácido ácido incluyen una sal con ácido aspártico, ácido glutámico o similares.

En particular, los ejemplos de sales preferidas, en el caso de que un compuesto tenga un grupo funcional ácido en el compuesto, son las sales inorgánicas tales como las sales de metales alcalinos (p. ej., sales de sodio, sal de potasio, etc.) y las sales de metales alcalinotérreos (p. ej., sal de calcio, sal de magnesio, sal de bario, etc.) y la sal de amonio, tal como las sales orgánicas; y en el caso de que un compuesto tenga un grupo funcional básico en el compuesto son una sal con un ácido inorgánico (p. ej., ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc.) y una sal con una sal orgánica (p. ej., ácido acético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido metanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, etc.).

La composición farmacéutica para prevenir y tratar el cáncer que comprende el oligonucleótido modificado más arriba podría comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, además de un ingrediente activo. Los ejemplos de vehículo farmacéuticamente aceptable, en el caso de una inyección, son un conservante, un agente isotónico, un anestésico, un solubilizante, un tamponante, etc., o una mezcla de los mismos; en el caso de una administración oral son un solubilizante, un aglutinante, un diluyente, un disgregante, un estabilizante, un agente de suspensión, un decolorante, un lubricante, aromatizante, etc.; y en el caso de una administración local están una base, un diluyente, un lubricante, un conservante, etc.

La preparación de la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en diferentes tipos al

mezclarla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, se puede preparar en forma de una ampolla de dosis unitaria o una forma de dosis múltiple en el caso de una inyección; se puede preparar en forma de un comprimido, un elixir, una cápsula, suspensión, trocisco, oblea, jarabe en el caso de una administración oral; y otras formas, que incluyen una suspensión, un comprimido, una píldora, una cápsula y una preparación de liberación prolongada, o similares.

Ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes idóneos para las preparaciones farmacéuticas incluyen celulosa microcristalina, xilitol, eritritol, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, lactosa, dextrosa, sacarosa, propilhidroxibenzoato, celulosa, agua, metilhidroxibenzoato, estearato de magnesio, talco, sorbitol, manitol, maltitol, fosfato de calcio, silicato de calcio, aceite mineral, o similar.

10 En la presente invención, «administración» se refiere a la introducción de una determinada sustancia en un paciente por cualquier vía adecuada. La vía de administración de un ingrediente activo no está limitada, sino que se puede aplicar cualquier vía de administración con tal de que pueda servir para hacer llegar una determinada sustancia farmacológica a un tejido diana, por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración oral, administración intramuscular, administración intraperitoneal, administración intrapulmonar, administración rectal, administración local, administración intranasal, administración intradérmica, pero no está limitado a estas. Sin embargo, ya que los oligonucleótidos son digeridos cuando se administran por vía oral, la composición farmacéutica para la administración oral se debe preparar de tal modo que pueda descomponerse y absorberse en el tubo digestivo. Preferiblemente, se podría administrar por inyección o a través de una vía internasal.

20 El contenido del ingrediente activo de las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se puede seleccionar idóneamente según la capacidad de absorción del ingrediente activo, relación de inactivación, tasa de excreción, edad de un usuario, sexo y estado de salud, etc. En la presente invención, el contenido del ingrediente activo es de 1 a 1000 mg/kg, preferiblemente de 100 mg/kg y se podría administrar de 1 a 3 veces al día, o se podría administrar continuamente por infusión durante un periodo de tiempo determinado.

25 La presente invención se describe a continuación, pero no se debe interpretar que limita el alcance de la presente invención según se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de los oligonucleótidos modificados

30 Los nuevos oligonucleótidos modificados se sintetizaron con un sintetizador de ADN (Polygene, Inc.) en una escala de 1 µM con una química estándar de fosoramiditas en fase sólida. En Glen Research Corporation se adquirieron la desoxiguanosina, la timidina, la desoxicitidina, la 5-fluorodesoxiuridina (sin estar conforme a la invención), el Ara-C y la fosoramidita de TMP-5-fluorodesoxiuridina, y a continuación se disolvieron en acetonitrilo seco a una concentración de 0,067 M, y se cargaron en el sintetizador de ADN en fase sólida.

35 El ADN se sintetizó en la dirección 3'→5' para preparar los oligonucleótidos cuya secuencia se muestra en la tabla 1 que viene a continuación. Con el 3'-OH del primer nucleótido adherido a la resina, una reacción química de cuatro etapas que comprende la destrilación del extremo 5', el acoplamiento de una nueva base, la protección de la cadena de ADN sin conjugar, y la oxidación del grupo fosfato se repitió mientras que se añadía una base. Tras finalizar la reacción, se retiró el protector. Así pues, la resina de CPG sintetizada se añadió a una solución de amonio y se dejó a 55 °C durante 5 horas. A continuación, la solución de amonio se secó para finalmente obtener un producto en forma de polvo blanco. El resultante se purificó con una columna de HPLC de intercambio de cationes de Waters, en donde la concentración de NaCl a 1 M se incrementó al 5-70%. A continuación, se recogieron los picos principales y se les añadió etanol al 100% para precipitar los oligonucleótidos, que se secaron después. Así pues, los oligonucleótidos obtenidos se analizaron por HPLC y se encontró que tenían una pureza de más del 85%. Su masa molecular se midió por ESI-LC-MS (ESI-MS Q-TRAP 2000) para determinar el éxito de la síntesis.

45 Los oligonucleótidos modificados se pueden sintetizar mediante el método anterior con las secuencias oligonucleotídicas que ya se describieron con el propósito del tratamiento terapéutico o diferentes secuencias que muestran actividades fisiológicas que forman una estructura de cuarteto de G, además de las secuencias mostradas en la tabla 1 que viene a continuación.

Tabla 1

Comp. n.º	N	G	H	Secuencia	LC/MS
APT-2001*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	-	NNNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGG (SEQ. ID. NO. 1)	9232.53
APT-2001B	5-F-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina		NNNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGG (SEQ. ID. NO. 1)	9220.77

ES 2 598 555 T3

APT-2002*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	NNNGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGG TGG (SEQ. ID. NO. 2)	9196.89
APT-2002B	5-F-desoxicidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	NNNGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGG TGG (SEQ. ID. NO. 2)	9193.95
APT-2003*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG NNNG (SEQ. ID. NO. 3)	9526.1
APT-2003B	Arabinósido de citosina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG NNNG (SEQ. ID. NO. 3)	9517.16
APT-2003C	5-F-desoxicidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG NNNG (SEQ. ID. NO. 3)	9523.16
APT-2004*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	-	GGNGGNGGNGGNNNGGNGGNGGNGG G (SEQ. ID. NO. 4)	8308.1
APT-2005*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	-	GGNGGNGGNGGNNNGGNGGNGGNGG G (SEQ. ID. NO. 5)	8287
APT-2007*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	-	GGGNNNNGGNNNNGGNNNNGGG (SEQ. ID. NO. 6)	7586.6
APT-2008*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	-	GGNGGNNNNGGNGG (SEQ. ID. NO. 7)	4420.7
APT-2009*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	-	GGNGGNGGNGG (SEQ. ID. NO. 8)	3496.2
APT-2010*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	-	GGNNNNGG (SEQ. ID. NO. 9)	2487
APT-2011*	5-yodo-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	-	NNNGGNGGNGGNGGNNNGGNGGNGG GNGG (SEQ. ID. NO. 1)	10799.4
APT-2012	Arabinósido de citosina	2-desoxi-guanosina	-	NNNGGNGGNGGNGGNNNGGNGGNGG GNGG (SEQ. ID. NO. 1)	9468.76
APT-2013*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	NNNGGNGGNGGNGGTTGTGGNGGNG GNGG (SEQ. ID. NO. 10)	9220.7
APT-2014*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	NNNGGTGGTGGTGGNNGGTTGGTGG TGG (SEQ. ID. NO. 11)	9208.8
APT-2015*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGNGGNGGTTTTGGNGGNGGNG G (SEQ. ID. NO. 12)	8271.2
APT-2015B*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	2'-desoxicidina	GGNGGNGGNGGCCCGGNGGNGGNG G (SEQ ID NO. 13)	8211.08

ES 2 598 555 T3

APT-2015C	Arabinósido de citosina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGNGGNGGCCCGGNGGNGGNG G (SEQ ID NO. 13)	8193.10
APT-2016*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGNNNNGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 14)	8263.2
APT-2017*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGNGGNGGNNNNGGTGGTGGTGG G (SEQ ID NO. 15)	8275.1
APT-2018*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGNNNNGGNGGNGGNG G (SEQ ID NO. 16)	8275.1
APT-2019*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGNGGTTTTGGNGGNGG (SEQ ID NO. 17)	6338
APT-2019B	Arabinósido de citosina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGNNNNGGTGGTGG (SEQ ID NO. 18)	6326.08
APT-2020*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGNNNNGGTGGTGG (SEQ ID NO. 18)	6338
APT-2021*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGTTTTGGNGG (SEQ ID NO. 19)	4404.8
APT-2022*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGNNNNGGTGG (SEQ ID NO. 20)	4412.8
APT-2023*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGTGGNGG (SEQ ID NO. 21)	3492.2
APT-2024*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTNNTGG (SEQ ID NO. 22)	2479.6
APT-2025	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	-	GGNGGNGGNGGNNNGGNGGNGGNGGNG G (SEQ ID NO. 4)	8461.2
APT-2026	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGGNNNNGGGNNNNGGGNNNNGGG (SEQ ID NO. 6)	7790.7
APT-2027	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGNNNNGGNGG (SEQ ID NO. 7)	4522.8
APT-2028	Arabinósido de citosina	2-desoxi-guanosina	-	GGNGGNGGNGGNNNGGNGGNGGNGGNG G (SEQ ID NO. 4)	8281.2
APT-2030	Arabinósido de citosina	2-desoxi-guanosina	-	GGNGGNNNNGGNGG (SEQ ID NO. 7)	4402.8
APT-2031*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTNNTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 23)	6326
APT-2032*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTTNTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 24)	6324.1
APT-2033*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTTTTNGGTGGTGG (SEQ ID NO. 25)	6324.1
APT-2034*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTNNNGGTGGTGG (SEQ ID NO. 26)	6328
APT-2035	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTTNTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 24)	6343.1
APT-2037*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGNNGGNGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 27)	8284.3
APT-2038*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-	Timidina	GGTGGTGGTGGTNNNGGTGGTGGTGG	8259.3

ES 2 598 555 T3

		guanosina		(SEQ ID NO. 28)	
APT-2039*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTNNTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 29)	8255.3
APT-2040*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTTNTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 30)	8251.3
APT-2041*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTTGNGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 31)	8276.3
APT-2042*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGNGGNGGTTGTGGNGGNGGNG G (SEQ ID NO. 32)	8296.3
APT-2043*	5-F-desoxiuridina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGNGGTGGTTGTGGTGGNGGNG G (SEQ ID NO. 33)	8288.3
APT-2044	5-F-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGNGG (SEQ ID NO. 34)	8280.3
APT-2050	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	NNGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGT GG (SEQ ID NO. 35)	8922.7
APT-2051	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	NGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTG G (SEQ ID n.º 36)	8597.5
APT-2054	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTTNTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 30)	8268
APT-2059	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTNNTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 23)	6364.1
APT-2060	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGNTGTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 37)	6368.1
APT-2061	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTNGTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 38)	6368.1
APT-2062	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTTGNGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 39)	6368.1
APT-2063	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTNGNGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 40)	6389.1
APT-2064	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGTGGTTGTGGTGGNGG (SEQ ID NO. 41)	6389.1
APT-2065	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGNGGTTGTGGNGGTGG (SEQ ID NO. 42)	6389.1
APT-2066	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTNNTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 29)	8289.3
APT-2067	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTNGTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 43)	8293.3
APT-2068	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTTGNGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 31)	8293.3
APT-2069	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGTGGTGGTNGNGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 44)	8314.3
APT-2070	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGNGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG (SEQ ID NO. 45)	8314.3
APT-2071	2',2'-difluoro-desoxicitidina	2-desoxi-guanosina	Timidina	GGTGGNGGTGGTTGTGGTGGNGGTGG (SEQ ID NO. 46)	8314.3
APT-2072	2',2'-difluoro-	2-desoxi-	Timidina	GGTGGTGGTTNTGGTGGTGGN	6668.3

	desoxicitidina	guanosina		(SEQ ID NO. 47)	
APT-4001* (Control posit.)	-	2-desoxi-guanosina	Timidina	TTTGGTGGTGGTGGTGTGGTGGTGGT GG (SEQ. ID. NO. 48)	9185.01
APT-4002* (Control negat.)	-	-	Timidina, 2'-desoxicitidina	TTTCCTCCTCCTCCTTCTCCTCCTCCTC C (SEQ. ID. NO. 49)	8504.5

* Señala los oligonucleótidos que no son conforme a la invención.

Ejemplo 2: Síntesis de oligonucleótidos modificados

Cada oligonucleótido se diluyó en Tris-HCl a 10 mM (pH 7,4) para dar una concentración final de 100 µM. La solución diluida se colocó a 94 °C durante 5 minutos y a continuación se colocó rápidamente en hielo y se dejó en él durante 5 minutos. Al resultante se le añadió KCl a 2 M para dar una concentración final de 50 mM, se dejó a 60 °C durante 3 horas y después se enfrió lentamente a temperatura ambiente.

Ejemplo experimental 1: medición de la apoptosis celular en las células cancerosas

Un día antes del experimento, en cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos se inocularon 190 µl del cultivo, en donde la línea de células PC-3 (células de cáncer de próstata) estaba suspendida a una concentración de 10^3 - 10^4 /ml. Al día siguiente, se añadieron 10 µl de la solución de oligonucleótido preparada en el ejemplo 1 y se cultivó durante seis días. Seis días después de la inoculación, la tasa de la apoptosis celular se midió por medio del método XTT [JBC 1999, 26369].

Como resultado, se confirmó que la tasa de apoptosis celular de APT-2001, APT-2002 y APT-2003 (que no son conforme a la invención) era de 3 a 10 veces más alta que la de APT-4001 (control positivo) y APT-4002 (control negativo) según se midió en términos de CI_{50} o CI_{90} (figura 2). Además, APT-2001, APT-2002 y APT-2003, incluso en una cantidad más pequeña que la de APT-4001 (control positivo), mostraron una actividad apoptótica celular superior (figura 3). Además, se observó que otros oligonucleótidos nuevos que se prepararon tenían una excelente actividad apoptótica celular. De hecho, mostraron una excelente actividad apoptótica celular sobre diferentes líneas de células cancerosas, entre ellas PC3, MCF7, HCT116, A549, A498, K562, MV-4-11, etc, lo que confirma que tienen un amplio espectro de actividad contra el cáncer. En particular, también mostraron una excelente actividad contra el cáncer contra MCF7-DX, una línea de células resistente a los fármacos. La actividad apoptótica celular mencionada más arriba se muestra en las tablas 2 a 7. Además, también se verificó la actividad apoptótica celular de los oligonucleótidos sobre células de LMC (leucemia mielógena crónica) K562 y LMA (leucemia aguda) MV-4-11. Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5, respectivamente.

Tabla 2: PC3 (células de cáncer de próstata)

SEQ ID n.º	CI_{50} (µM)
APT-2001*	0,7
APT-2002*	2,6
APT-2003*	1,5
APT-2013*	0,09
APT-2020*	0,16
APT-2022*	0,11
APT-2023*	0,26
APT-2031*	> 10
APT-2032*	> 10
APT-2033*	> 10
APT-2034*	> 10
APT-2035	0,035
APT-2054	< 0,3
APT-2059	0,015
APT-2060	0,04

APT-2061	0,041
APT-2063	0,022
APT-2064	0,016
APT-2066	0,034
APT-2070	0,024
APT-2072	0,012
APT-4001*	4,3-7,4
APT-4002*	> 50

* Señala los oligonucleótidos que no son conforme a la invención.

Tabla 3: MCF7-DX (células de cáncer de mama)

SEQ ID n.º	CI ₅₀ (µM)
APT-2001*	0,2
APT-2002*	0,6
APT-2013*	0,66
APT-2020*	0,89
APT-2022*	0,79
APT-2023*	1,86
APT-2031*	1,5
APT-2032*	3,6
APT-2033*	3,3
APT-2034*	1,2
APT-2035	0,007
APT-2040*	> 1,0
APT-2042*	0,5
APT-2043*	0,6
APT-2044	> 1,0
APT-2054	< 0,3
APT-2059	0,004
APT-2060	0,023
APT-2061	0,022
APT-2063	0,008
APT-2064	0,008
APT-2066	0,01
APT-2067	0,024
APT-2068	0,023
APT-2069	0,01
APT-2070	0,013
APT-2071	0,015
APT-4001*	> 30
APT-4002*	> 50

* Señala los oligonucleótidos que no son conforme a la invención.

Tabla 4: MCF7 (células de cáncer de mama)

SEQ ID n.º	CI ₅₀ (µM)
APT-2001*	2,1
APT-2002*	8,9
APT-4001*	7,3
APT-4002*	NA

* Señala los oligonucleótidos que no son conforme a la invención.

5 Tabla 5: HCT116 (células de cáncer colorrectal)

SEQ ID n.º	CI ₅₀ (µM)
APT-2001*	0,4
APT-2002*	2,1
APT-4001*	> 30
APT-4002*	> 50

* Señala los oligonucleótidos que no son conforme a la invención.

Tabla 6: A549 (células de carcinoma no microcítico)

SEQ ID n.º	CI ₅₀ (µM)
APT-2001*	0,9
APT-2002*	5,2
APT-4001*	3,7
APT-4002*	> 50

* Señala los oligonucleótidos que no son conforme a la invención.

10

Tabla 7: A498 (células de cáncer de riñón)

SEQ ID n.º	CI ₅₀ (µM)
APT-2001*	<0,1
APT-2002*	<0,1
APT-4001*	1,9
APT-4002*	> 50

* Señala los oligonucleótidos que no son conforme a la invención.

Ejemplo experimental 2: confirmación de la formación del cuarteto de G

- 15 La formación de la estructura de cuarteto de G en los oligonucleótidos preparados en el ejemplo 1 de más arriba se examinó mediante el análisis por DC (dicroísmo circular). Las soluciones de oligonucleótidos preparadas en el ejemplo 1 se diluyeron correspondientemente en el tampón de fosfato de potasio a 10 mM para dar una concentración final de 1 nM y se conservaron en un congelador. Cada oligonucleótido se diluyó en el tampón de fosfato de potasio a 10 mM para dar una concentración final de 100 µM para obtener una solución de 2 ml, y se
- 20 analizó mediante el análisis por DC (dicroísmo circular). Se observaron los espectros de DC con el espectropolarímetro JARSCO J-810 a 20 °C en el margen de 320 nm a 220 nm, con una velocidad de escaneo de 100 nm/min, un tiempo de respuesta de 0,5 s, un ancho de banda de 2 nm y una longitud de paso de 1 cm.

Como resultado, se demostró que había un pico máximo a 264 nm y también se confirmó que mostraba el mismo espectro de DC que APT-4001, un control positivo que se sabe que forma la estructura de cuarteto de G.

- De lo anterior, se confirmó que los oligonucleótidos modificados forman la estructura de cuarteto de G, como se describe en la técnica relacionada sobre la formación de la estructura de cuarteto de G (M. Lu, Q. Guo, N. R. Kallenback, *Biochemistry*, 1992, 31, 2455; P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20, 4061; *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91, 1994, 7658-7662; *Biochemistry*, 1997, 36, 12498; *Biochemistry*, 2002, 41, 3676) [figuras 6 a 8].

Ejemplo experimental 3: prueba de toxicidad

La prueba de toxicidad se realizó como se describe a continuación.

- 10 Cada uno de APT-2001, APT-2002 y APT-2003 (ninguno es conforme a la invención) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), se diluyeron con agua y a continuación se administraron a ratones (10 ratones/grupo) en la cantidad de 1 g/kg. Los ratones se vigilaron durante los siguientes 7 días y se confirmó que todos los ratones sobrevivieron.

Ejemplo de preparación 1: preparación del líquido de inyección

- 15 El líquido de inyección que contiene 10 mg de APT-2001 se preparó como se describe a continuación.

Se disolvieron en agua destilada 1 g de APT-2001 (no es conforme a la invención), 0,6 g de cloruro de sodio y 0,1 g de ácido ascórbico hasta dar un volumen final de 100 ml. La mezcla se añadió en un vial y se esterilizó por calentamiento a 20 °C durante 30 minutos.

(Formulación del líquido para inyección)

- | | | |
|----|--------------------|-------------------|
| 20 | Ingrediente activo | 1 g |
| | Cloruro de sodio | 0,6 g |
| | Ácido ascórbico | 0,1 g |
| | Agua destilada | Cantidad adecuada |

Lista de secuencias

<110> Aptabio Therapeutics Ltd.

<120> Nuevos oligonucleótidos modificados ricos en guanósina y actividad antiproliferativa de los mismos

<150> KR10-2009-0058498

5 <151> 2009-06-29

<150> KR10-2010-0051202

<151> 2010-05-31

<160> 49

<170> KopatentIn 1.71

10 <210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido modificado

<400> 1

nnnggngngng gnggnngngg nggngngngg 29

<210> 2

<211> 29

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido modificado

<400> 2

25 nnnggtggtg gtggttggg tgggtggtg 29

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido modificado

<400> 3

ggtggtggtg gttggtggtg tgggggnng 30

<210> 4

35 <211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido modificado

40 <400> 4

ggnggngngng gnngngngng nggngg 26

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido modificado

<400> 5

ggnggngngng gnngngngng nggngg 26

- <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
- <400> 6
 gggnnnnggg nnnnggggnn nggg 24
- 10 <210> 7
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido modificado
- 15 <400> 7
 ggnggnnng gngg 14
- <210> 8
 <211> 11
 <212> DNA
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido modificado
- <400> 8
 ggnggngng g 11
- 25 <210> 9
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 30 <223> oligonucleótido modificado
- <400> 9
 ggnnnngg 8
- <210> 10
 <211> 29
- 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido modificado
- <400> 10
 40 nnnngngng gnggtgtgg ngngngngg 29
- <210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
- <400> 11
 nnnngtgtg gtggnngngg tgggtgtg 29
- <210> 12
 50 <211> 26
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 12
 5 ggnggngng gtttgngg ngngg 26
 <210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 13
 ggnggngng gccccgngg ngngg 26
 <210> 14
 15 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 20 <400> 14
 ggtggtggtg gnnnggtg tggg 26
 <210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 15
 ggnggngng gnnnggtg tggg 26
 30 <210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 16
 ggtggtggtg gnnngngg ngngg 26
 <210> 17
 <211> 20
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 17
 45 ggngngggtt ttgngngg 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>

<223> oligonucleótido modificado
 <400> 18
 ggtggtggnn nnggtggtgg 20
 <210> 19
 5 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 10 <400> 19
 ggnggttttg gngg 14
 <210> 20
 <211> 14
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 20
 ggtggnnnng gtgg 14
 20 <210> 21
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 21
 ggnggtggng g 11
 <210> 22
 <211> 8
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 22
 35 ggtnttgg 8
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 23
 ggtggtggtg ntggtggtgg 20
 <210> 24
 45 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 50 <400> 24

ggtggtggtt ntggtggtg 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 25
 ggtggtggtt tnggtggtg 20
 10 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 26
 ggtggtggtt nnggtggtg 20
 <210> 27
 <211> 26
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 27
 25 ggtggtggtg gnngnggtg tggtg 26
 <210> 28
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 28
 ggtggtggtg gtnnnggtg tggtg 26
 <210> 29
 35 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 40 <400> 29
 ggtggtggtg gtnntggtg tggtg 26
 <210> 30
 <211> 26
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido modificado
 <400> 30
 ggtggtggtg gttntggtg tggtg 26
 50 <210> 31

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 31
 ggtggtggtg gttgnggtgg tgggtg 26

 <210> 32
 <211> 26
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 32
 15 ggnggngng gttgtgngg ngngg 26

 <210> 33
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 33
 ggnggnggtg gttgtggtg ngngg 26

 <210> 34
 25 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

 30 <400> 34
 ggnggtggtg gttgtggtg tggngg 26

 <210> 35
 <211> 28
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 35
 nnggtggtg tggttggtt ggtgtg 28

 40 <210> 36
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 36
 nggtggtgtt ggttgtggt gtggtg 27

 <210> 37
 <211> 20
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 37
 ggtggtggnt gtggtggtg 20

 5 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 38
 ggtggtggtn gtggtggtg 20

 <210> 39
 <211> 20
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 39
 20 ggtggtggtt gnggtggtg 20

 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 40
 ggtggtggtn gnggtggtg 20

 <210> 41
 30 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 41
 35 gnggtggtt gtggtgngg 20

 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

 <400> 42
 ggtgngggtt gtgnggtg 20

 <210> 43
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> oligonucleótido modificado

<400> 43
 ggtggtggtg gtngtgggtg tgggtg 26

<210> 44
 <211> 26
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido modificado

<400> 44
 10 ggtggtggtg gtngnggtg tgggtg 26

<210> 45
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> oligonucleótido modificado

<400> 45
 gnggtggtg gttgtggtg tgggtg 26

<210> 46
 20 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido modificado

25 <400> 46
 ggtgnggtg gttgtggtg nggtg 26

<210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido modificado

<400> 47
 ggtggtggtt ntggtggtg n 21

35 <210> 48
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> oligonucleótido

<400> 48
 fttggtggtg gtggtggtg tgggtggtg 29

<210> 49
 <211> 29
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

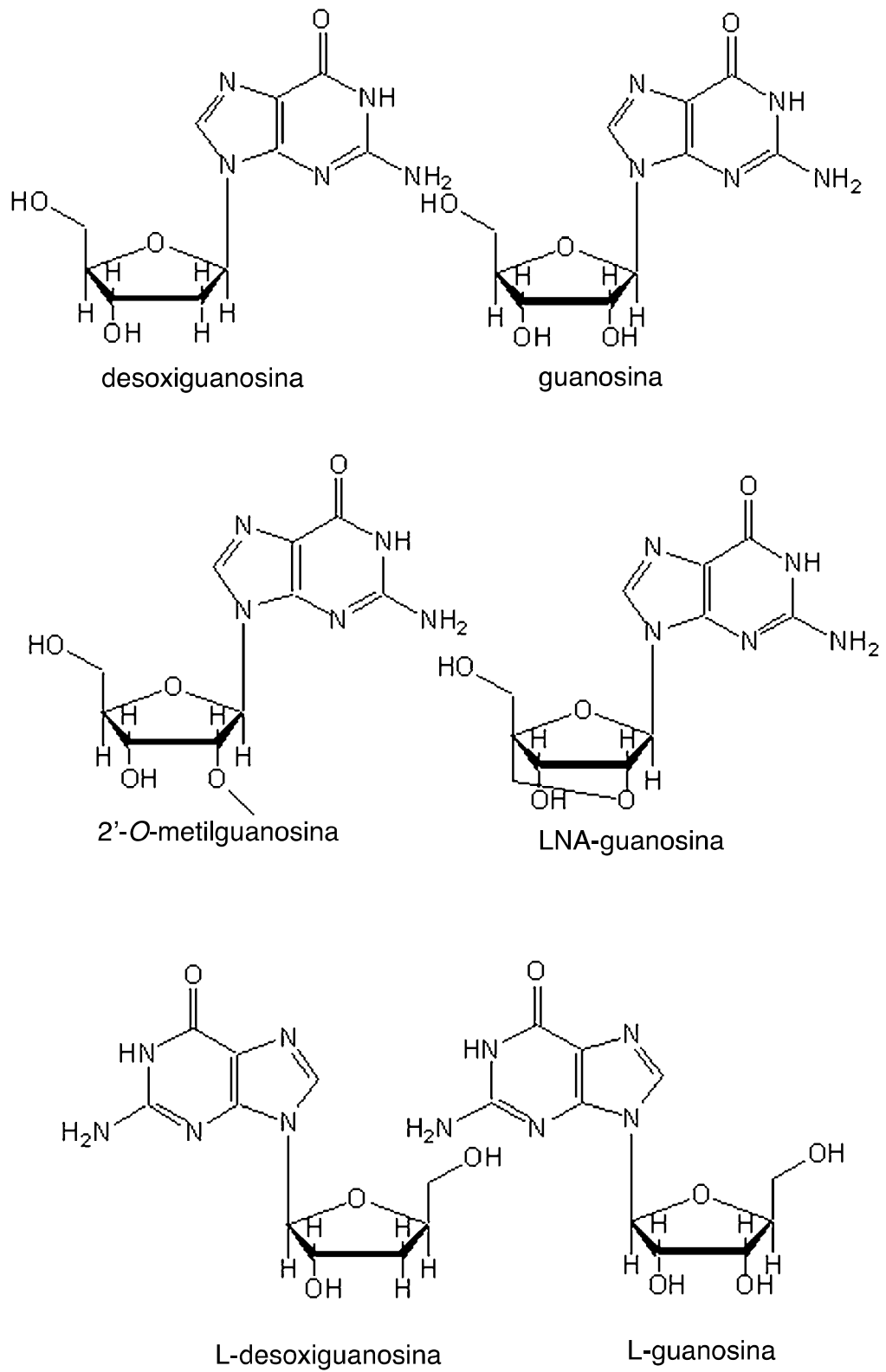
<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 49
 50 fttcctcctc ctccctctcc tctcctcc 29

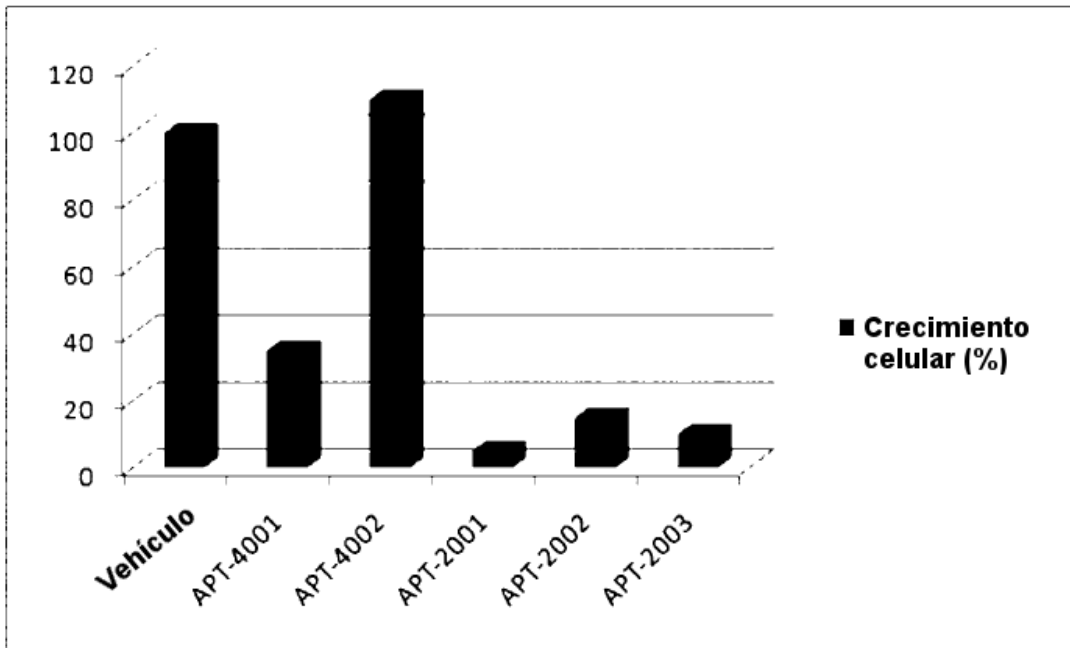
REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido modificado indicado por la secuencia nucleotídica 'GxHyNz', en donde G es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en 2-desoxiguanosina, guanosina, 2'-O-metilguanosina, 2'-F-guanosina, LNA (ácido nucleico bloqueado)-guanosina, D-desoxiguanosina y D-guanosina; H es un ácido nucleico exclusivo de guanosina; N es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en 5-fluorodesoxicitidina, 5-fluorocitidina, 5-yododesoxicitidina, 5-yodocitidina, arabinósido de citosina/Ara-C, 2',2'-difluorodesoxicitidina/gemcitabina y capecitabina, en donde G, H, N se distribuyen al azar; x es un entero de 1 a 30, y es un entero de 0 a 30, z es un entero de 1 a 30, en donde la suma de $(x + y + z)$ no es mayor que 60, en donde el oligonucleótido modificado se selecciona de las SEQ ID n.^{os} 1, 2, 3, 4, 6, 7, 13, 18, 23, 24, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47.
2. El oligonucleótido modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde H es adenosina, citidina, uridina o timidina, y en donde la suma de $(x + y + z)$ está en el intervalo de 14 a 26, en donde el oligonucleótido modificado se selecciona de las SEQ ID n.^{os} 6, 7, 13, 18, 23, 24, 29, 30, 31, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47.
3. Una composición farmacéutica o su sal farmacéuticamente aceptable, que comprende como ingrediente activo el oligonucleótido modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para prevenir o tratar el cáncer.

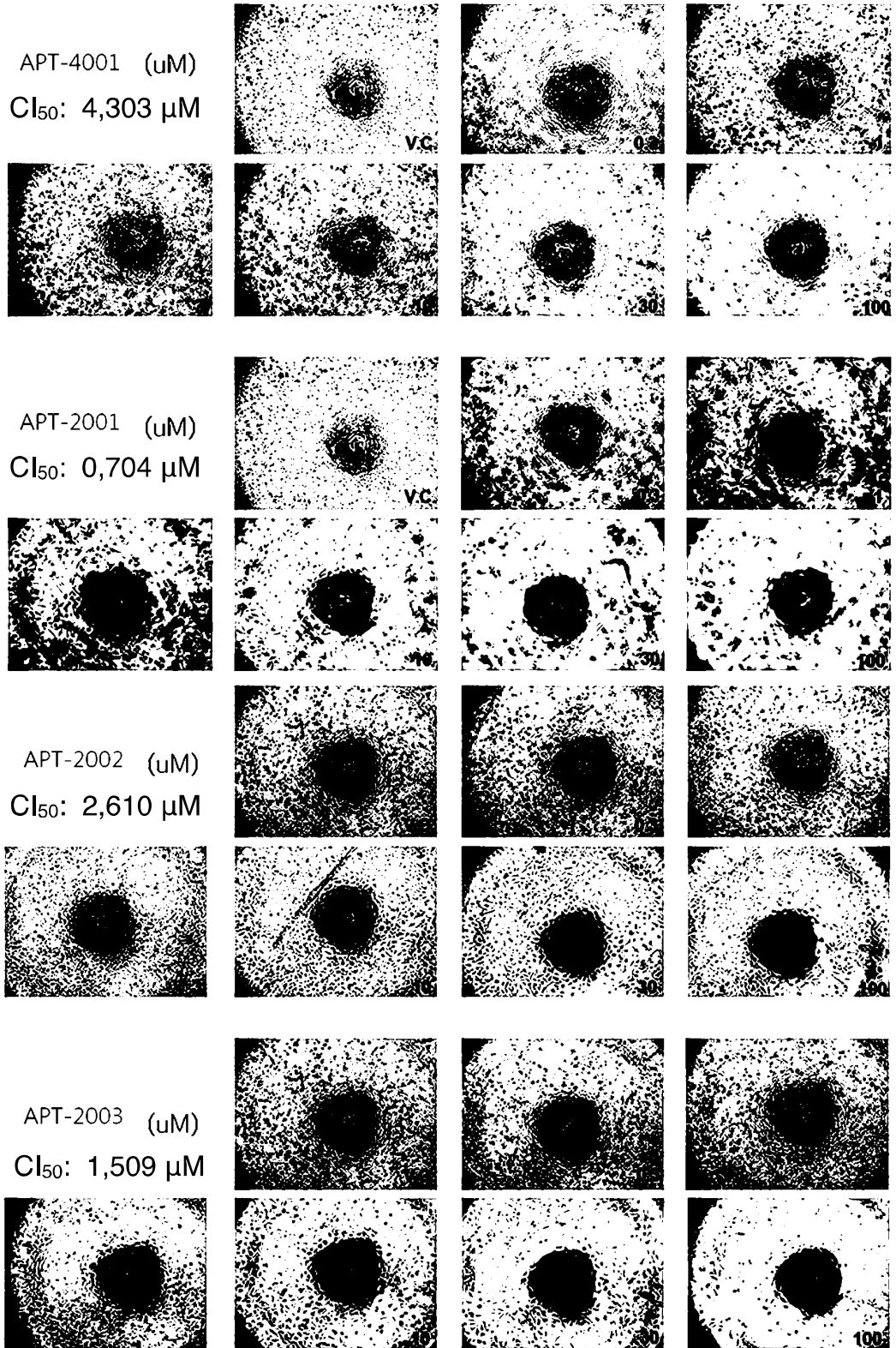
[Fig. 1]



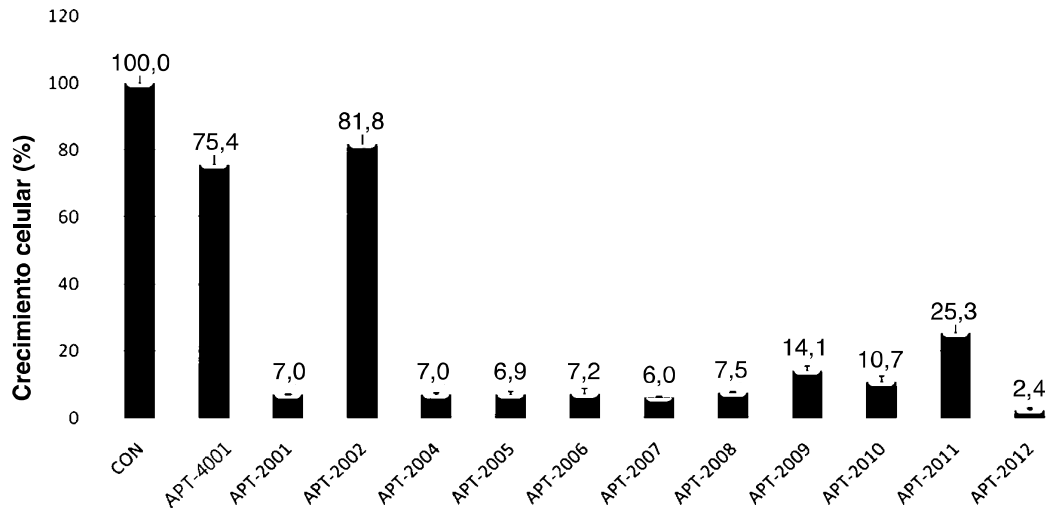
[Fig. 2]



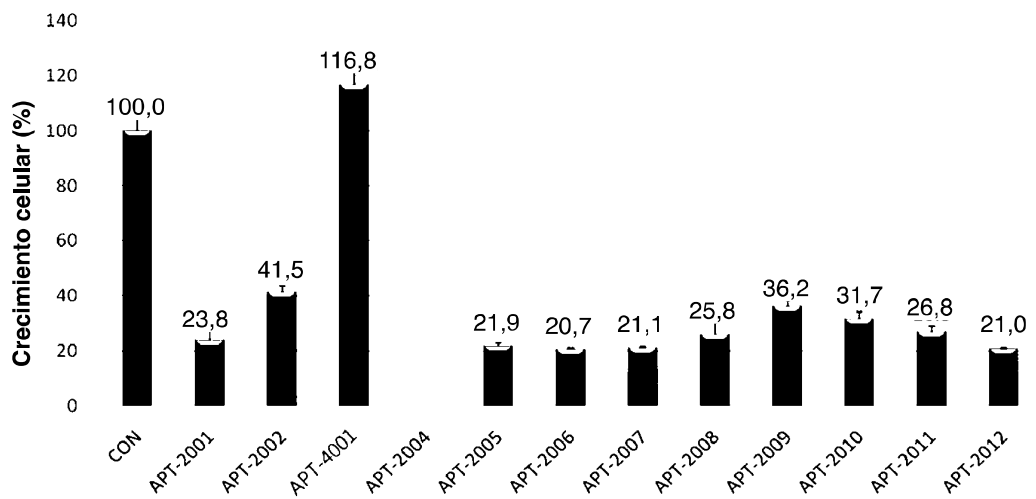
[Fig. 3]



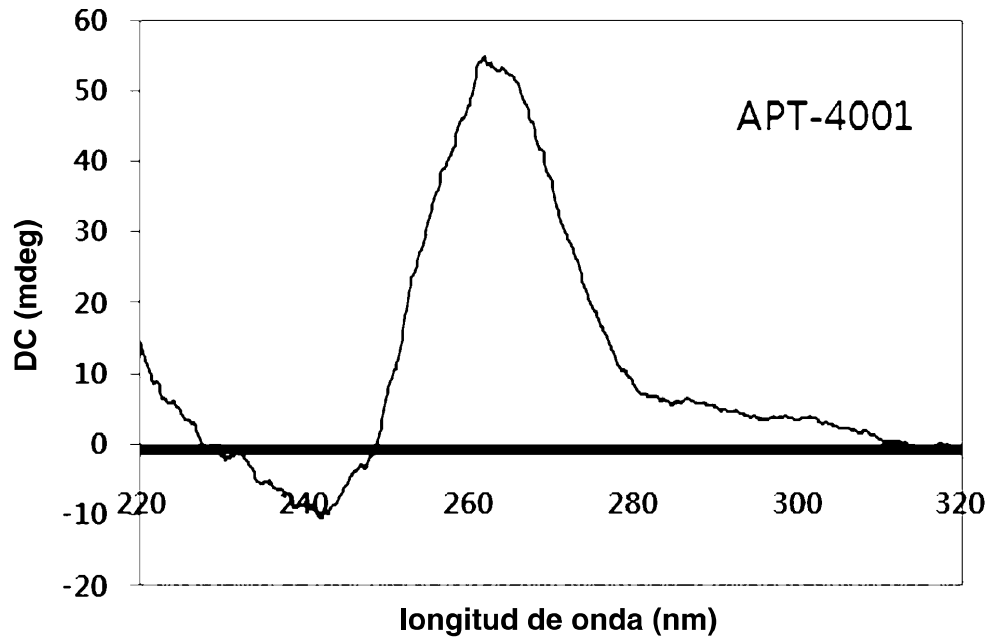
[Fig. 4]



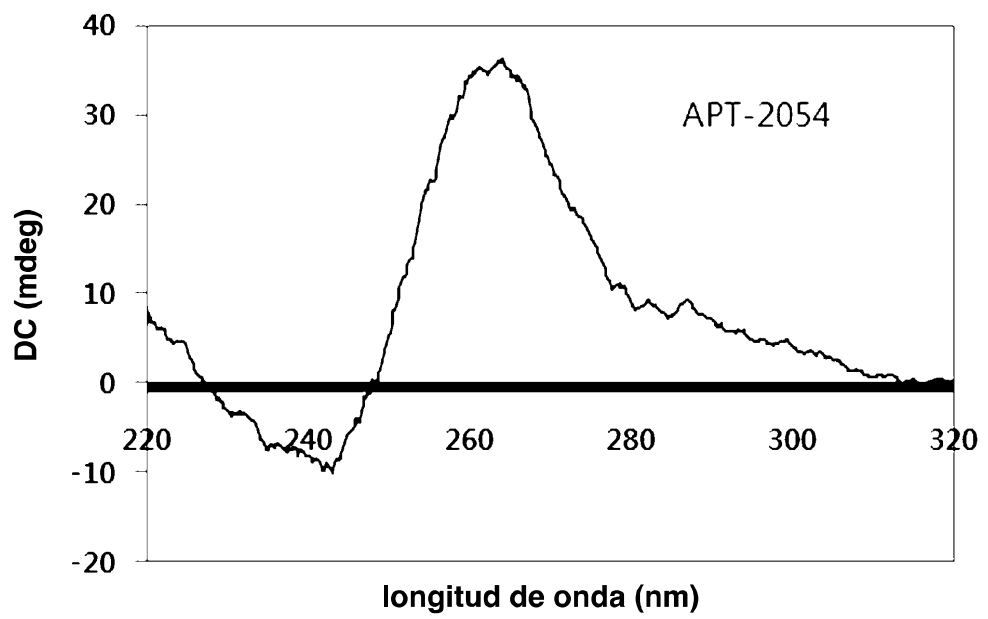
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

