

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 817**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2003 E 10175232 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2264172**

54 Título: **Compuestos oligoméricos para la modulación de la expresión de HIF-1 α**

30 Prioridad:

05.04.2002 US 370126 P

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

15.01.2018

73 Titular/es:

**ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN
A/S (100.0%)
Fremtidsvej 3
2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**THRUE, CHARLOTTE;
HØG, ANJA y
KRISTJANSEN, PAUL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 649 817 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos oligoméricos para la modulación de la expresión de HIF-1 α

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud es una continuación de la solicitud provisional de EE. UU. con número de serie 60/370.126, presentada el 5 de abril de 2002, cuya solicitud se incorpora por completo en el presente documento como referencia.

10

Campo de la invención

La presente invención proporciona composiciones y procedimientos para modular la expresión de HIF-1 α . En particular, la presente invención se refiere a compuestos oligoméricos y, preferentemente, dichos compuestos son oligonucleótidos que se pueden hibridar específicamente con ácidos nucleicos que codifican HIF-1 α . Los compuestos oligonucleotídicos han demostrado que modulan la expresión de HIF-1 α y se divulgan preparaciones farmacéuticas de los mismos y su uso como tratamiento de enfermedades oncológicas y preeclampsia.

15

20 **Antecedentes de la invención**

Los tumores sólidos deben establecer un aporte sanguíneo y han potenciado que el metabolismo de la glucosa aumente más allá de unos pocos milímetros. La forma en que detectan la hipoxia y cómo responden activando genes inducibles por hipoxia y secretando factores angiogénicos para establecer un sistema sanguíneo es fundamental para la biología del cáncer. Muchos tumores contienen microambientes hipóxicos, que se han asociado a la progresión maligna, la metástasis y la resistencia a la radioterapia y la quimioterapia.

25

El descubrimiento del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) ha ayudado a comprender la regulación de los genes inducibles por hipoxia (documentos US 5882914 y WO9639426; documento WO9948916). El HIF-1 se compone de dos subunidades, HIF-1 α y HIF-1 β , y se une a los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) en potenciadores de genes que codifican factores angiogénicos tales como VEGF y proteínas relacionadas con la glucólisis tales como las enzimas glucolíticas y los transportadores de glucosa 1 y 3 (GLU-1 y 3).

30

Se ha demostrado que la regulación negativa genomificada de HIF-1 α mediante transferencia génica intratumoral de un plásmido de HIF-1 α antisentido da lugar a la regulación negativa del VEGF y a una reducida densidad de microvasos tumorales (documento WO 0076497, Sun X *et al.*, Gene Therapy (2001) 8, 638-645). El plásmido contenía un fragmento de ADNc de 320 pb que codificaba el extremo 5' de HIF-1 α (nucleótidos 152-454, Genbank AF003698). Además, en la solicitud de patente internacional citada anteriormente se describió un procedimiento basado en que el vector de expresión se debería usar junto con un agente inmunoterapéutico. Sin embargo, un defecto importante del enfoque del plásmido de expresión es que no es adecuado como agente terapéutico debido a su tamaño y a la sensibilidad a las nucleasas del producto de expresión.

35

40

Además del plásmido que expresa un fragmento de HIF-1 α , se han diseñado unos pocos oligonucleótidos antisentido dirigidos a HIF-1 α como herramientas de investigación para estudiar un mecanismo biológico o diana biológica específicos. Por ejemplo, la inhibición antisentido de la expresión de HIF-1 α en explantes hipóxicos ha demostrado que inhibe la expresión de TGF β (Caniggia, I., *et al.*, J. of Clinical Investigation, marzo 2000, 105, 577-587). En este estudio particular solo se sintetizó un oligonucleótido antisentido, un fosforotioato dirigido a la secuencia adyacente al codón de iniciación AUG del ARNm de HIF-1 α . Las secuencias fueron 5'-GCCGGCGCCCTCCAT-3' de HIF-1 α y la regulación negativa de HIF-1 α se demostró a nivel de ARNm. Este oligonucleótido se ha usado para estudiar el papel de HIF-1 α en la invasión y excrecencia del trofoblasto extravascular, y se ha implicado en el papel potencial de HIF-1 α en la preeclampsia (Caniggia, I. *et al.*, Placenta (2000), 21, Suplemento A, Trophoblast Research 14, S25-S30).

45

50

Otro estudio, que usa la misma secuencia oligonucleotídica que anteriormente, demostró que la inhibición antisentido de HIF-1 α daba como resultado la pérdida de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) (Narravula, S. y Colgan S.P., J. of Immunology, 2001, 166, 7543-7548). El oligonucleótido mencionado anteriormente también se ha usado para demostrar que el níquel requiere HIF-1 α para inducir el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (Andrew, A.S. Klei L.R., Barchowsky A., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 281, L607-L615, 2001).

55

También se ha usado un oligonucleótido antisentido único para estudiar las dos variantes de empalme del factor inducible por hipoxia HIF-1 α como potencial compañero de dimerización de ARNT2 en las neuronas. El oligonucleótido antisentido fue la modificación de fosforotioato de la secuencia: 5'-TCTTCTCGTTCTCGCC-3'. El tratamiento de las células con este oligonucleótido dio como resultado la inhibición de la incorporación de [³H]-timidina, pero no tuvo un efecto sobre la apoptosis en células normóxicas (Drutel *et al.* (2000) Eur. J. Neurosci. 12, 3701-3708).

65

Además, un oligonucleótido antisentido único para HIF-1 α ha demostrado que inhibe la expresión génica incrementada de la endotelina cardíaca (ET)-1 y se ha barajado la hipótesis de que HIF-1 α estuviera implicado en la expresión miocárdica incrementada del gen ET-1 en la insuficiencia cardíaca (Kakinuma, Y. *et al.*, *Circulation*, 2001; 103, 2387-2394). El oligonucleótido antisentido tenía la siguiente secuencia: CCTCCATGGCGAATCGGTGC.

Se han descrito oligonucleótidos adicionales capaces de inhibir la síntesis de HIF-1-alfa sin divulgar las secuencias oligonucleotídicas como tales; véase, por ejemplo, Kang *et al.* 2001 *Circulation* vol. 104(17) pp. 1157 y Hoeg *et al.* 2002 *Proc of Am. Assoc. Cancer Res.* Vol. 43 p. 962. Hoeg *et al.* se refiere específicamente a oligonucleótidos antisentido de ANB dirigidos a HIF-1-alfa. Actualmente no se conocen agentes antisentido terapéuticos que inhiban eficazmente la síntesis de HIF-1 α y que se puedan usar para el tratamiento de una enfermedad. En consecuencia, existe la necesidad de obtener agentes capaces de inhibir eficazmente que se use la función de HIF-1 α en el tratamiento de, por ejemplo, el cáncer y la preeclampsia.

Resumen de la invención

La presente invención se dirige a un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de HIF-1 α en al menos un 20 % a un nivel de oligonucleótido de 100 nM, en el que la secuencia oligonucleotídica es TGGCAAGCATCCTGTA (SEQ ID NO. 55). También se proporcionan composiciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden los oligonucleótidos antisentido de la invención. Se proporcionan adicionalmente procedimientos de modulación de la expresión de HIF-1 α en células o tejidos que comprenden poner en contacto dichas células o tejidos con los oligonucleótidos antisentido o composiciones de la invención. También se divulgan procedimientos de tratamiento de un animal o un ser humano que se sospecha que tienen o son propensos a tener una enfermedad o afección asociada a la expresión de HIF-1 α administrando una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de los oligonucleótidos antisentido o composiciones de la invención. Adicionalmente, se proporcionan procedimientos de uso de los oligonucleótidos antisentido para la inhibición de la expresión de HIF-1 α y para el tratamiento de enfermedades asociadas a la expresión de HIF-1 α . Los ejemplos de dichas enfermedades son diferentes tipos de cáncer, particularmente cánceres comunes, como, por ejemplo, cáncer primario y metastásico de mama, colorrectal, de próstata, de páncreas, otros cánceres GI, tumores pulmonares, cervicouterinos, ováricos y cerebrales, así como preeclampsia, enfermedad intestinal inflamatoria y enfermedad de Alzheimer. Otros ejemplos son cáncer de colon, hígado, tiroides, riñón, testículos, estómago, intestino, esófago, médula espinal, senos nasales, vejiga o vías urinarias.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un Western blot de la proteína HIF-1 α . Las células se trataron con los diferentes oligonucleótidos a 100 nM durante 4 horas. Se dejó que las células crecieran durante 18 horas antes de exponerlas a hipoxia intensa durante 6 horas.

La Figura 2 muestra un Western blot de la proteína HIF-1 α . Se trataron células U87 con tres de los oligonucleótidos a 200 nM durante 4 horas. Las células se expusieron a hipoxia intensa durante 18 horas inmediatamente después del tratamiento.

La Figura 3 muestra Western blot de HIF-1 α , VEGF Glut 1 y proteína tubulina en células U87 tratadas con oligonucleótido Cur0813. Las células se trataron con oligonucleótido durante 24 horas a 100 nM, 200 nM, 300 nM y 400 nM. Las células se expusieron a hipoxia intensa durante 18 horas inmediatamente después del tratamiento.

La Figura 4 muestra Western blot de HIF-1 α y proteína tubulina en células U87 tratadas con oligonucleótidos con emparejamiento erróneo (Cur0960 y Cur0961). Las células se trataron con oligonucleótido durante 24 horas a 100 nM, 200 nM, 300 nM y 400 nM. Las células se expusieron a hipoxia intensa durante 18 horas inmediatamente después del tratamiento.

La Figura 5 muestra Western blot de HIF-1 α , VEGF y proteína tubulina en células 15PC3 tratadas con oligonucleótido Cur813. Las células se trataron con oligonucleótido durante 16 horas a 125 nM, 25 nM, 5 nM y 1 nM. Las células se expusieron a hipoxia intensa durante 6 horas inmediatamente después del tratamiento.

La Figura 6 muestra Western blot de HIF-1 α y proteína tubulina en células 15PC3 tratadas con diferentes oligonucleótidos a 5 nM durante 16 horas. Las células se expusieron a hipoxia intensa durante 6 horas inmediatamente después del tratamiento.

La Figura 7 muestra Western blot de HIF-1 α y proteína tubulina en células U373 tratadas con diferentes oligonucleótidos a 100 nM durante 6 horas. Las células se expusieron a hipoxia intensa durante 20 horas inmediatamente después del tratamiento.

La Figura 8 muestra Western blot de HIF-1 α y proteína tubulina en células U373 tratadas con diferentes

oligonucleótidos a 100 nM durante 6 horas. Las células se expusieron a hipoxia intensa durante 20 horas inmediatamente después del tratamiento.

5 La Figura 9 muestra curvas de crecimiento de xenoinjertos tumorales de U373 tratados con PBS o Cur813 a 5 mg/kg/día i.p. 1 vez al día durante 7 días. Las barras representan errores estándar.

La Figura 10 muestra la secuencia de HIF-1 α humano, usando el número de acceso a GenBank NM_001530, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO. 1.

10 Definición

Como se usa en el presente documento, el término "**ácido nucleico diana**" abarca ADN que codifica el factor inducible por hipoxia o que codifica el factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α), ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN y también ADNc derivado de dicho ARN.

15 Como se usa en el presente documento, el término "**gen**" significa el gen que incluye exones, intrones, regiones 5' y 3' no codificantes y elementos reguladores y todas las variantes conocidas actualmente del mismo y cualquier variante adicional que se pueda elucidar.

20 Como se usa en el presente documento, el término "**compuesto oligomérico**" se refiere a un oligonucleótido que puede inducir un efecto terapéutico deseado en seres humanos a través de, por ejemplo, la unión mediante enlaces de hidrógeno a un gen diana "Chimeraplast" y "TFO", al(a los) transcrito(s) de ARN de los "inhibidores antisentido" del gen diana, "ARNip", "ribozimas" y "oligozimas" o bien a la(s) proteína(s) codificada(s) por el "aptámero", Spiegelmer o "señuelo" del gen diana.

25 Como se usa en el presente documento, el término "**ARNm**" significa el(los) transcrito(s) de ARNm conocido(s) actualmente de un gen diana, y cualquier transcrito adicional que se pueda identificar.

30 Como se usa en el presente documento, el término "**modulación**" significa un incremento (estimulación) o una reducción (inhibición) en la expresión de un gen. En la presente invención, la inhibición es la forma preferente de modulación de la expresión génica y el ARNm es una diana preferente.

35 Como se usa en el presente documento, el término "**dirigido a**" un compuesto antisentido con respecto a un ácido nucleico diana particular significa proporcionar el oligonucleótido antisentido a la célula, animal o ser humano de modo que el compuesto antisentido se pueda unir a y modular la función de su diana pretendida.

40 Como se usa en el presente documento, "**hibridación**" significa enlaces de hidrógeno, que pueden ser Watson-Crick, Hoogsteen, enlaces de hidrógeno de Hoogsteen invertidos, etc. entre bases nucleosídicas o nucleotídicas complementarias. Hace aproximadamente cincuenta años, Watson y Crick demostraron que el ácido desoxirribonucleico (ADN) está compuesto de dos cadenas que se mantienen unidas en una configuración helicoidal mediante enlaces de hidrógeno formados entre nucleobases complementarias opuestas en las dos cadenas. Las cuatro nucleobases, comúnmente encontradas en el ADN, son guanina (G), adenina (A), timina (T) y citosina (C), de las cuales la nucleobase G se aparea con C, y la nucleobase A se aparea con T. En el ARN, la nucleobase timina se reemplaza por la nucleobase uracilo (U) que, de manera similar a la nucleobase T, se aparea con A. Los grupos

45 químicos de las nucleobases que participan en la formación de dúplex estándar constituyen la cara Watson-Crick. Un par de años más tarde, Hoogsteen demostró que las nucleobases de purina (G y A), además de su cara Watson-Crick, tienen una cara Hoogsteen que se puede reconocer desde fuera de un dúplex y se puede usar para unir oligonucleótidos de pirimidina por medio de enlaces de hidrógeno, formando así una estructura de triple hélice.

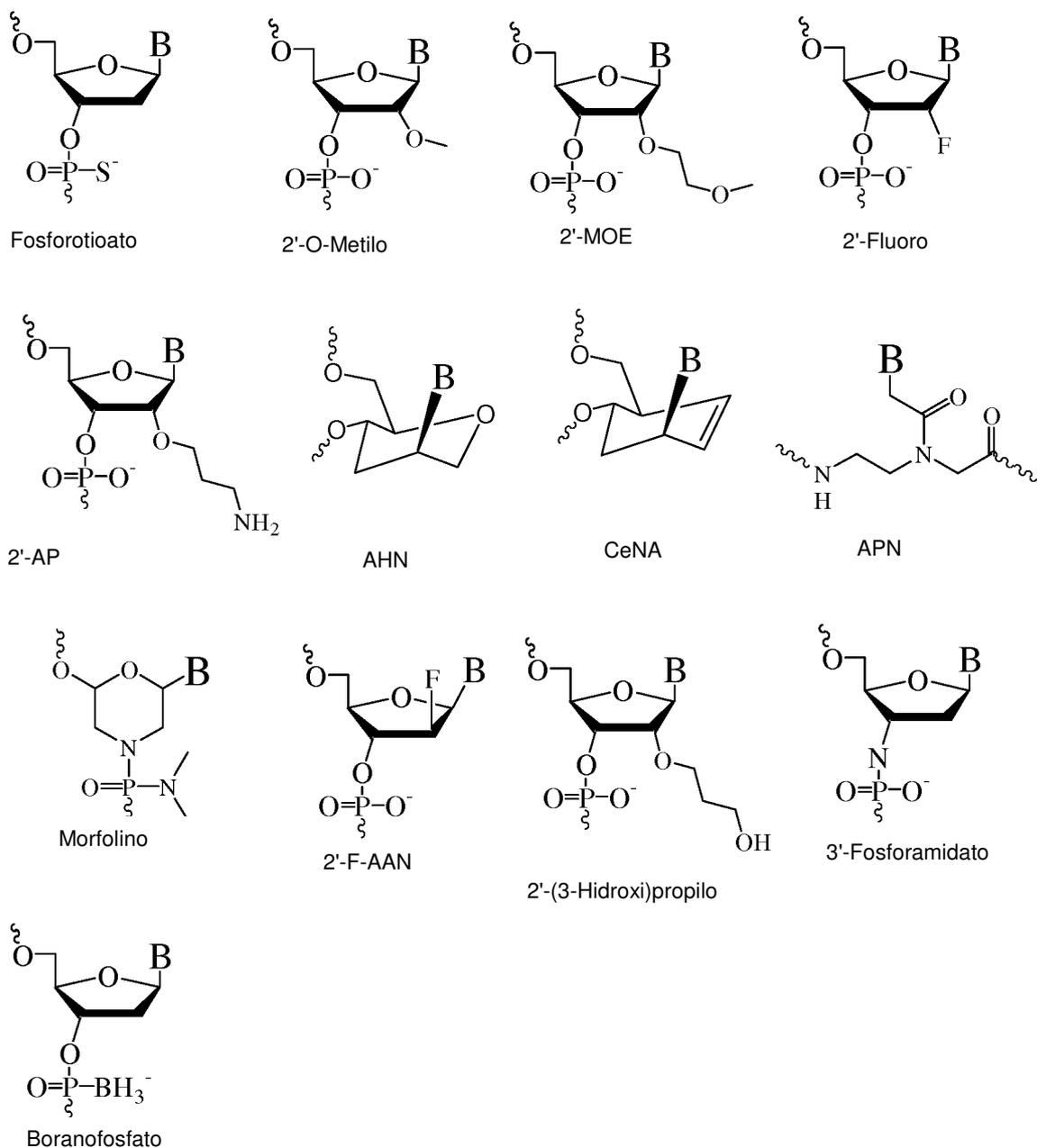
50 En el contexto de la presente invención, "**complementario**" se refiere a la capacidad de apareamiento preciso de dos secuencias nucleosídicas o nucleotídicas entre sí. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición de un oligonucleótido se puede unir mediante enlaces de hidrógeno a un nucleótido en la posición correspondiente de una molécula de ADN o ARN, entonces se considera que el oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí en esa posición. El ADN o ARN y el oligonucleótido se consideran complementarios entre sí cuando un

55 número suficiente de nucleótidos del oligonucleótido pueden formar enlaces de hidrógeno con los nucleótidos correspondientes del ADN o ARN diana para posibilitar la formación de un complejo estable. Para ser estable *in vitro* o *in vivo*, la secuencia de un compuesto antisentido no necesita ser 100 % complementaria a su ácido nucleico diana. De esta manera, los términos "complementario" y "hibrizable específicamente" implican que el compuesto antisentido se una lo suficientemente fuerte y específicamente a la molécula diana para proporcionar la interferencia deseada con la función normal de la diana, mientras se mantiene invariable la función de los ARNm no diana.

60

El término "**análogos de ácidos nucleicos**" se refiere a un ácido nucleico no natural que se une a un compuesto. Los análogos de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en Freier & Altmann (Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443) y Uhlmann (Curr. Opinion in Drug & Development (2000, 3(2): 293-213). El Esquema 1 ilustra ejemplos

65 seleccionados.



Esquema 1

El término “**ANB**” (ácido nucleico bloqueado) se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más análogos de nucleósidos bicíclicos, también denominado monómero de ANB. Los monómeros de ANB se describen en el documento WO 9914226 y solicitudes posteriores, los documentos WO0056746, WO0056748, WO0066604, WO00125248, WO0228875, WO2002094250 y PCT/DK02/00488. Un ejemplo particular de un monómero de ANB de timidina es el (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroxi metil-5-metil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxa-biciclo[2:2:1]heptano.

5

El término “**oligonucleótido**” se refiere, en el contexto de la presente invención, a un oligómero (también llamado oligonucleótido) o polímero de ácido nucleico (por ejemplo, ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) o análogo de ácido nucleico de los conocidos en la técnica, preferentemente ácido nucleico bloqueado (ANB) o una mezcla de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos (cadena principal), así como oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de manera similar o con funciones mejoradas específicas. A menudo son preferentes oligonucleótidos modificados o sustituidos completa o parcialmente frente a las formas naturales debido a varias propiedades deseables de dichos oligonucleótidos, tales como, por ejemplo, la capacidad para atravesar una membrana celular, buena resistencia a las nucleasas extra- e intracelulares, alta afinidad y especificidad por el ácido nucleico diana. El análogo de ANB que presenta las propiedades mencionadas anteriormente es particularmente preferente.

10

15

Por el término "**unidad**" se entiende un monómero.

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

El término "**tio-ANB**" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos uno de X o Y en el Esquema 2 se selecciona entre S o -CH₂-S-. El tio-ANB puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

10 El término "**amino-ANB**" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos uno de X o Y en el Esquema 2 es -N(H)-, N(R)-, CH₂-N(H)- o -CH₂-N(R)-, en los que R se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄. El amino-ANB puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

15 El término "**oxi-ANB**" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos uno de X o Y en el Esquema 2 representa O o -CH₂-O-. El oxi-ANB puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

El término "**ena-ANB**" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en el Esquema 2 es -CH₂-O-.

20 El término "**alfa-L-ANB**" comprende un nucleótido bloqueado representado como se muestra en el Esquema 3.

El término "**derivados de ANB**" comprende todos los nucleótidos bloqueados del Esquema 2, excepto beta-D-metilen-ANB, por ejemplo, tio-ANB, amino-ANB, alfa-L-oxi-ANB y ena-ANB.

25 Descripción detallada de la invención

La presente solicitud describe compuestos oligoméricos, particularmente oligonucleótidos antisentido, para su uso en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican HIF-1 α . La modulación es fundamentalmente un cambio en la cantidad de HIF-1 α producido. En un modo de realización, esto se logra proporcionando compuestos antisentido que se hibridan específicamente con ácidos nucleicos que codifican HIF-1 α .
30 La modulación es preferentemente una inhibición de la expresión de HIF-1 α , lo que da lugar a una reducción del número de proteínas funcionales producidas. HIF-1 puede estar implicado en la angiogénesis, así como en la proliferación de glóbulos rojos, proliferación celular, metabolismo del hierro, metabolismo energético y de la glucosa, regulación del pH, invasión de tejidos, apoptosis, resistencia a múltiples fármacos, respuesta al estrés celular o metabolismo de la matriz.

35 Los compuestos antisentido y otros compuestos oligoméricos descritos en la solicitud, que modulan la expresión de la diana, se identifican a través de experimentación o a través de un diseño racional basado en la información sobre la secuencia de la diana y en el conocimiento sobre la mejor manera de diseñar un compuesto oligomérico frente a una diana deseada. Asimismo, los motivos de secuencia en la diana que son complementarios a los compuestos oligoméricos descritos en la solicitud (denominados "puntos calientes") son sitios para la unión a la diana.

40 Los compuestos oligoméricos descritos en la solicitud son SEQ ID NO. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 o 115 y sus secuencias se presentan en la Tabla 1 y la Tabla 2. Los compuestos oligoméricos descritos en la solicitud son potentes moduladores de la diana. Esto se demostró experimentalmente tanto *in vitro* como *in vivo*. La inhibición *in vitro* de la diana se muestra en la tabla 1 y en las Figuras 1-8 usando tres líneas celulares de cáncer diferentes. La Figura 9 muestra la regulación negativa *in vivo* de la diana. Además, los compuestos oligoméricos han demostrado ser potentes inhibidores a una concentración mucho menor que, por ejemplo, la condición estándar para los oligonucleótidos antisentido con fosforotioato. Las Figuras 5 y 6 muestran la inhibición de los compuestos de la invención hasta 5 nM. La inhibición de HIF-1 α por los compuestos oligoméricos de la invención también puede inhibir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que se sabe que está implicado en la angiogénesis y del transportador de glucosa 1 (GLUT-1) que se sabe que está implicado en la captación de glucosa como se muestra en las Figuras 3 y 5. Diversos diseños de compuestos oligoméricos mostrados en la tabla 2 dirigidos a dos motivos se identificaron como potentes inhibidores de la diana, como se muestra en las Figuras 1 y 7. Se realizó un paseo génico usando los compuestos oligoméricos de la tabla 1, y el efecto de los potentes compuestos oligoméricos se muestra en la Figura 8. Todas las observaciones experimentales mencionadas anteriormente demuestran que los compuestos descritos en la solicitud pueden constituir el compuesto activo en una composición farmacéutica.

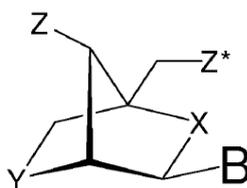
Además, los compuestos oligoméricos descritos en la solicitud pueden inhibir el HIF-1 α bajo normoxia e hipoxia.

65 En un modo de realización de la invención, los oligonucleótidos antisentido contienen al menos una unidad química llamada ANB (ácido nucleico bloqueado).

Monómero de ANB se refiere típicamente a un análogo de nucleósido bicíclico, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 99/14226 y solicitudes posteriores, los documentos WO0056746, WO0056748, WO0066604, WO00125248, WO0228875, WO2002094250 y PCT/DK02/00488, todos incorporados en el presente documento como referencia.

5

Las estructuras de monómeros de ANB preferentes se ejemplifican en el Esquema 2.



Esquema 2

10

X e Y se seleccionan independientemente entre los grupos -O-, -S-, -N(H)-, N(R)-, -CH₂- o -CH- (si es parte de un doble enlace), -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-N(H)-, -CH₂-N(R)-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CH- (si es parte de un doble enlace), -CH=CH-, en los que R se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄. Los grupos asimétricos se pueden encontrar en cualquier orientación.

15

En el Esquema 2, los 4 centros quirales se muestran en una configuración fija. Sin embargo, en la presente invención también están comprendidos compuestos del Esquema general 2 en los que los centros quirales se encuentran en diferentes configuraciones. De esta manera, cada centro quiral del Esquema 2 puede existir en la configuración R o S. La definición de R (derecha) y S (izquierda) se describe en las Recomendaciones de la IUPAC de 1974, Sección E, Estereoquímica Fundamental. Las reglas se pueden encontrar en Pure Appl. Chem. 45, 13-30 (1976) y en "Nomenclature of organic Chemistry" Pergamon, Nueva York, 1979.

20

Z y Z* se seleccionan independientemente entre un enlace internucleosídico, un grupo terminal o un grupo protector.

25

El enlace internucleosídico puede ser -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, -O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, en los que R^H se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄.

30

Los grupos terminales se seleccionan independientemente entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, alquiltio C₁₋₆, amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono- o di(alquilo C₁₋₆)amino, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinoxilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquiloxilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, monofosfato o monofosfato protegido, monotiofosfato o monotiofosfato protegido, difosfato o difosfato protegido, ditiofosfato o ditiofosfato protegido, trifosfato o trifosfato protegido, tritiofosfato o tritiofosfato protegido. Los ejemplos de dichos grupos protector en los residuos de fosfato son S-acetiltoietilo (SATE) o S-pivaloiltioetilo (*t*-butil-SATE), intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxi, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, Act-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-Act-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, en los que Prot es un grupo protector para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, Act es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, y R^H se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆.

35

40

45

Los grupos protectores de sustituyentes hidroxilo comprenden tritilo sustituido, tal como 4,4'-dimetoxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT) y tritiloxi, 9-(9-fenil)xanteniloxi (pixilo) opcionalmente sustituido, metoxitetrahidropiraniloxi (mthp) opcionalmente sustituido, sililoxi tal como trimetilsililoxi (TMS), triisopropilsililoxi (TIPS), *tert*-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi y fenildimetilsililoxi, éteres *tert*-butílicos, acetales (incluyendo dos grupos hidroxilo), aciloxi tal como acetilo o acetilos sustituidos con halógeno, por ejemplo, cloroacetiloxi o fluoroacetiloxi, isobutiriloxi, pivaloiloxi, benzoiloxi y benzoílos sustituidos, metoximetiloxi (MOM), éteres bencílicos o éteres bencílicos sustituidos tales como 2,6-diclorobenciloxi (2,6-Cl₂Bzl). De manera alternativa, cuando Z o Z* es hidroxilo, se pueden proteger opcionalmente mediante fijación a un soporte sólido a través de un enlazador.

50

55

Cuando Z o Z* son grupos amino, los ejemplos ilustrativos de los grupos protectores amino son fluorenilmetoxicarbonilamino (Fmoc), *tert*-butiloxicarbonilamino (BOC), trifluoroacetilamino, aliloxicarbonilamino (alloc, AOC), Z-benciloxicarbonilamino (Cbz), benciloxicarbonilaminos sustituidos tales como 2-clorobenciloxicarbonilamino (2-C1Z), monometoxitritilamino (MMT), dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino y 9-(9-fenil)xantenilamino (pixilo).

60

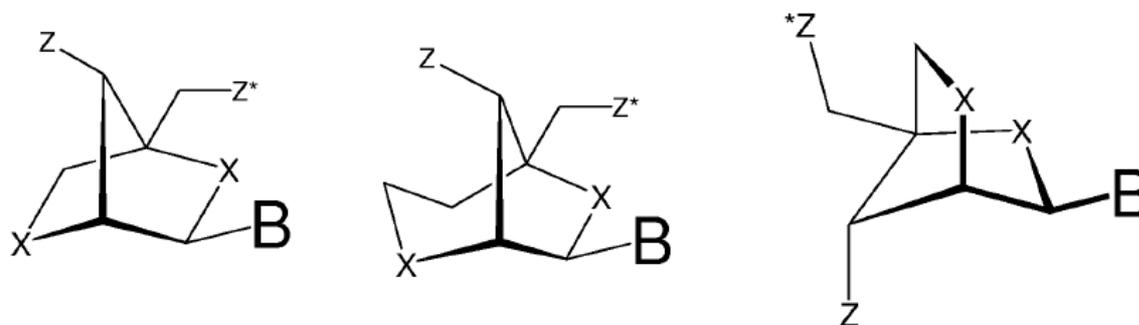
En el modo de realización anterior, Act designa un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H). En un modo de

realización preferente, dichos activadores median acoplamiento a otros residuos, monómeros. Después de que dichas fijaciones se realicen con éxito, el grupo Act se convierte en un enlace internucleosídico. Dichos grupos de activación se seleccionan, por ejemplo, entre O-fosforamidita opcionalmente sustituida, O-fosforotriéster opcionalmente sustituido, O-fosforodiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido y O-fosfonato opcionalmente sustituido.

En el presente contexto, el término "**fosforamidita**" significa un grupo de fórmula $-P(OR^X)-N(R^Y)_2$, en el que R^X designa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, metilo, 2-cianoetilo o bencilo, y cada uno de R^Y designa grupos alquilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo, etilo o isopropilo, o el grupo $-N(R^Y)_2$ forma un grupo morfolino ($-N(CH_2CH_2)_2O$). R^X designa preferentemente 2-cianoetilo y los dos R^Y son preferentemente idénticos y designan isopropilo. De esta manera, una fosforamidita especialmente pertinente es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)fosforamidita.

B constituye una nucleobase natural o no natural y se selecciona entre adenina, citosina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, guanina, timina, uracilo, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinil-6-fluorouracilo, 5-metilazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, 7-propin-7-desazaadenina, 7-propin-7-desazaguanina, 2-cloro-6-aminopurina.

Las estructuras bicíclicas particularmente preferentes se muestran en el Esquema 3 a continuación:



cuando al menos un $X = O$

Esquema 3

en el que X es $-O-$, $-S-$, $-NH-$ y $N(R^H)$,

Z y Z^* se seleccionan independientemente entre un enlace internucleosídico, un grupo terminal o un grupo protector.

El enlace internucleotídico puede ser $-O-P(O)_2-O-$, $-O-P(O,S)-O-$, $-O-P(S)_2-O-$, $-S-P(O)_2-O-$, $-S-P(O,S)-O-$, $-S-P(S)_2-O-$, $-O-P(O)_2-S-$, $-O-P(O,S)-S-$, $-S-P(O)_2-S-$, $-O-PO(R^H)-O-$, $-O-PO(OCH_3)-O-$, $-O-PO(NR^H)-O-$, $-O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-$, $-O-PO(BH_3)-O-$, $-O-PO(NHR^H)-O-$, $-O-P(O)_2-NR^H-$, $-NR^H-P(O)_2-O-$, $-NR^H-CO-O-$, en los que R^H se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} .

Los grupos terminales se seleccionan independientemente entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, alquiltio C_{1-6} , amino, Prot- $N(R^H)-$, Act- $N(R^H)-$, mono- o di(alquilo C_{1-6})amino, alcoxi C_{1-6} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, monofosfato, monotiofosfato, difosfato, ditioniofosfato, trifosfato, tritioniofosfato opcionalmente sustituidos, en los que Prot es un grupo protector para $-OH$, $-SH$ y $-NH(R^H)$, respectivamente, Act es un grupo de activación para $-OH$, $-SH$ y $-NH(R^H)$, respectivamente, y R^H se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_{1-6} .

Los grupos protectores de sustituyentes hidroxilo comprenden tritilo sustituido tal como 4,4'-dimetoxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT), 9-(9-fenil)xanteniloxi (pixilo) opcionalmente sustituido, metoxitetrahidropiraniloxi (mthp) opcionalmente sustituido, sililoxi tal como trimetilsililoxi (TMS), triisopropilsililoxi (TIPS), *tert*-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi y fenildimetilsililoxi, éteres *tert*-butílicos, acetales (incluyendo dos grupos hidroxilo), aciloxi tal como acetilo. De manera alternativa, cuando Z o Z^* es hidroxilo, se pueden proteger opcionalmente mediante fijación a un soporte sólido a través de un enlazador.

Cuando Z o Z^* son grupos amino, los ejemplos ilustrativos de los grupos protectores amino son fluorenilmetoxicarbonilamino (Fmoc), *tert*-butiloxicarbonilamino (BOC), trifluoroacetilamino, aliloxicarbonilamino (alloc, AOC), monometoxitritilamino (MMT), dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino.

En el modo de realización anterior, Act designa un grupo de activación para $-OH$, $-SH$ y $-NH(R^H)$. En un modo de realización preferente, dichos activadores median acoplamiento a otros residuos, monómeros. Después de que

dichas fijaciones se realicen con éxito, el grupo Act se convierte en un enlace internucleosídico. Dichos grupos de activación se seleccionan, por ejemplo, entre O-fosforamidita opcionalmente sustituida, O-fosforotriéster opcionalmente sustituido, O-fosforodiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido y O-fosfonato opcionalmente sustituido.

5 En el presente contexto, el término "**fosforamidita**" significa un grupo de fórmula $-P(OR^x)-N(R^y)_2$, en el que R^x designa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, metilo, 2-cianoetilo, y cada uno de R^y designa grupos alquilo opcionalmente sustituidos, R^x designa preferentemente 2-cianoetilo y los dos R^y son preferentemente idénticos y designan isopropilo. De esta manera, una fosforamidita especialmente pertinente es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)fosforamidita.

B constituye una nucleobase natural o no natural y se selecciona entre adenina, citosina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, guanina, timina, uracilo, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, 2-cloro-6-aminopurina.

Principio terapéutico

Un experto en la técnica apreciará que los compuestos oligoméricos que contienen ANB se pueden usar para combatir enfermedades relacionadas con HIF-1 α mediante muchos principios diferentes.

20 Por ejemplo, los compuestos oligoméricos con ANB se pueden diseñar como inhibidores antisentido, que son ácidos nucleicos monocatenarios que previenen la producción de una proteína que provoca enfermedad, interviniendo a nivel del ARNm. Además, se pueden diseñar como ribozimas u oligozimas, que son oligonucleótidos antisentido que, además del(de los) dominio(s) de unión a diana, comprenden una actividad catalítica que degrada el ARNm diana (ribozimas) o comprenden una secuencia guía externa (EGS) que incorpora una enzima endógena (ARNasa P) que degrada el ARNm diana (oligozimas).

30 Los compuestos oligoméricos con ANB se pueden diseñar igualmente bien como ARNip, que son moléculas de ARN bicatenario pequeñas que son utilizadas por las células para silenciar genes endógenos o exógenos específicos mediante un mecanismo "de tipo antisentido" aún poco comprendido.

35 Los compuestos oligoméricos con ANB también se pueden diseñar como aptámeros (y una variación de los mismos, llamados Spiegelmer) que son ácidos nucleicos que, a través de enlaces de hidrógeno intramoleculares, adoptan estructuras tridimensionales que les permiten unirse a y bloquear sus dianas biológicas con alta afinidad y especificidad. Además, los compuestos oligoméricos con ANB se pueden diseñar como señuelos, que son ácidos nucleicos bicatenarios pequeños que previenen que los factores de transcripción celular transactiven sus genes diana bloqueando selectivamente su sitio de unión a ADN.

40 Además, los compuestos oligoméricos con ANB se pueden diseñar como quimeroplastos, que son ácidos nucleicos monocatenarios pequeños que se pueden aparear específicamente con una secuencia génica diana y alterarla. Los compuestos oligoméricos que contienen ANB que explotan este principio pueden ser particularmente útiles para tratar enfermedades relacionadas con HIF-1 α que están provocadas por una mutación en el gen HIF-1 α .

45 Finalmente, los compuestos oligoméricos con ANB se pueden diseñar como TFO (oligonucleótidos formadores de triples hélices), que son ácidos nucleicos que se unen a ADN bicatenario y previenen la producción de una proteína que provoca enfermedad, interviniendo a nivel de transcripción del ARN.

50 Dictados en parte por el principio terapéutico mediante el que se pretende que funcione el oligonucleótido, los compuestos oligoméricos con ANB de acuerdo con la presente invención comprenden preferentemente desde aproximadamente 8 a aproximadamente 60 nucleobases, es decir, desde aproximadamente 8 a aproximadamente 60 nucleósidos enlazados. Los compuestos particularmente preferentes son oligonucleótidos antisentido que comprenden desde aproximadamente 12 a aproximadamente 30 nucleobases y, lo más preferentemente, son compuestos antisentido que comprenden aproximadamente 12-20 nucleobases.

55 Haciendo referencia a los principios anteriores mediante los que un compuesto oligomérico con ANB puede ejercer su acción terapéutica, la diana de la presente invención puede ser el gen HIF-1 α , el ARNm o la proteína. En el modo de realización lo más preferente, los compuestos oligoméricos con ANB están diseñados como un inhibidor antisentido dirigido contra el pre-ARNm de HIF-1 α o el ARNm de HIF-1 α . Los oligonucleótidos descritos en la solicitud se pueden hibridar a cualquier sitio a lo largo del pre-ARNm o ARNm de HIF-1 α , tales como sitios en el líder no traducido en 5', exones, intrones y cola no traducida en 3'.

65 Los oligonucleótidos descritos en la solicitud se pueden hibridar a una porción del pre-ARNm o ARNm de HIF-1 α humano que comprenda el sitio de iniciación de la traducción. Más preferentemente, el oligonucleótido para HIF-1 α comprende una secuencia CAT, que es complementaria a la secuencia de iniciación AUG del pre-ARNm o ARNm de HIF-1 α . Otros oligonucleótidos para HIF-1 α se hibridan a una porción del sitio donante de empalme del pre-ARNm de HIF-1 α humano. Otros oligonucleótidos para HIF-1 α más se hibridan a una porción del sitio aceptor de empalme

del pre-ARNm de HIF-1 α humano. Otros oligonucleótidos para HIF-1 α se hibridan a porciones del pre-ARNm o ARNm de HIF-1 α humano implicadas en la poliadenilación, el transporte o la degradación.

5 El experto en la técnica apreciará que los oligonucleótidos preferentes son los que se hibridan a una porción del pre-ARNm o ARNm de HIF-1 α cuya secuencia no se produce comúnmente en transcritos de genes no relacionados para mantener la especificidad del tratamiento.

10 El compuesto oligomérico descrito en la solicitud se diseña para que sea suficientemente complementario a la diana para proporcionar la respuesta clínica deseada, por ejemplo, el compuesto oligomérico se debe unir con suficiente fuerza y especificidad a su diana para dar el efecto deseado. Los compuestos que modulan HIF-1 α también se pueden diseñar para modular también otros ácidos nucleicos específicos que no codifican HIF-1 α .

15 Es preferente que el compuesto oligomérico descrito en la solicitud se diseñe de manera que se evite la hibridación de oligonucleótidos intra- e intermolecular.

20 En muchos casos, la identificación de un compuesto oligomérico con ANB eficaz en la modulación de la actividad de HIF-1 α *in vivo* o clínicamente se basa en la información sobre secuencia del gen diana. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que dichos compuestos oligoméricos también se pueden identificar mediante pruebas empíricas. Como tales, los compuestos oligoméricos para HIF-1 α que tienen, por ejemplo, menos homología de secuencia, nucleótidos más o menos modificados o longitudes más o menos largas en comparación con los de los modos de realización preferentes, pero que, no obstante, muestran respuestas en tratamientos clínicos, también están dentro del alcance de la invención.

25 **Fármacos antisentido**

Los compuestos oligoméricos descritos en la solicitud son fármacos antisentido adecuados. El diseño de un fármaco antisentido potente y seguro requiere el ajuste de diversos parámetros, tales como afinidad/especificidad, estabilidad en fluidos biológicos, captación celular, modo de acción, propiedades farmacocinéticas y toxicidad.

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

35 Además de estas destacables propiedades de hibridación, los monómeros de ANB se pueden mezclar y actuar de manera cooperativa con monómeros de ADN y ARN, y con otros análogos de ácidos nucleicos tales como monómeros de ARN modificados con 2'-O-alquilo. Como tales, los oligonucleótidos de la presente invención pueden estar compuestos enteramente de monómeros de β -D-oxi-ANB o pueden estar compuestos de β -D-oxi-ANB en cualquier combinación con ADN, ARN o análogos de ácidos nucleicos existentes que incluyan derivados de ANB
40 tales como, por ejemplo, amino-, tio- y α -L-oxi-ANB. La afinidad de unión sin precedentes del ANB hacia secuencias diana de ADN o ARN y su capacidad para mezclarse libremente con ADN, ARN y una gama de análogos de ácidos nucleicos existentes tiene una gama de consecuencias importantes de acuerdo con la invención para el desarrollo de compuestos antisentido eficaces y seguros.

45 En primer lugar, en un modo de realización de la invención, se posibilita un acortamiento considerable de la longitud habitual de un oligonucleótido antisentido (desde 20-25 oligómeros hasta, por ejemplo, 12-15 oligómeros) sin comprometer la afinidad requerida para la actividad farmacológica. Dado que la especificidad intrínseca de un oligonucleótido está inversamente relacionada con su longitud, dicho acortamiento incrementa significativamente la especificidad del compuesto antisentido hacia su diana de ARN. Dado que la secuencia del genoma humano está
50 disponible y que la anotación de sus genes progresa rápidamente, un modo de realización de la invención consiste en identificar las secuencias únicas lo más cortas posible en el ARNm diana.

55 En otro modo de realización, el uso de ANB para reducir el tamaño de los oligonucleótidos facilita significativamente el procedimiento y el precio de fabricación, proporcionando de esta manera la base para que la terapia antisentido se convierta en una oferta de tratamiento comercialmente competitiva para una diversidad de enfermedades.

60 En otro modo de realización, la afinidad sin precedentes de ANB se puede usar para potenciar sustancialmente la capacidad de un oligonucleótido antisentido para hibridarse a su ARNm diana *in vivo*, reduciendo así significativamente el tiempo y el esfuerzo requeridos para identificar un compuesto activo en comparación con la situación con otros compuestos químicos.

65 En otro modo de realización, la afinidad sin precedentes de ANB se usa para potenciar la eficacia de los oligonucleótidos antisentido, permitiendo de esta manera el desarrollo de compuestos con ventanas terapéuticas más favorables que los que se encuentran actualmente en ensayos clínicos.

Cuando se diseñan como un inhibidor antisentido, los oligonucleótidos de la invención se unen al ácido nucleico

diana y modulan la expresión de su proteína análoga. Preferentemente, dicha modulación produce una inhibición de la expresión de al menos un 10 % o 20 % en comparación con el nivel de expresión normal, más preferentemente al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de inhibición en comparación con el nivel de expresión normal.

5 Típicamente, los oligonucleótidos de ANB de la invención contienen otros residuos distintos de β -D-oxi-ANB, tales como monómeros de ADN natural, monómeros de ARN, N3'-P5'-fosforamidatos, 2'-F, 2'-O-Me, 2'-O-metoxietilo (MOE), 2'-O-(3-aminopropilo) (AP), ácido hexitolnucleico (AHN), ácido 2'-F-arabinonucleico (2'-F-AAN) y D-ciclohexilnucleósido (CeNA). Además, el oligonucleótido con β -D-oxi-ANB modificado también puede contener
10 otras unidades de ANB además de, o en lugar de, un grupo oxi-ANB. En particular, las unidades de ANB adicionales preferentes incluyen monómeros de tio-ANB o amino-ANB en las configuraciones D- β o L- α o combinaciones de las mismas o ena-ANB. En general, un oligonucleótido con ANB modificado contiene al menos aproximadamente un 5, 10, 15 o 20 por ciento de unidades de ANB, basándose en el número total de nucleótidos del oligonucleótido, más típicamente al menos aproximadamente un 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de unidades de ANB,
15 basándose en el número total de bases del oligonucleótido.

Estabilidad en fluidos biológicos: un modo de realización de la invención incluye la incorporación de monómeros de ANB en un oligonucleótido de ADN o ARN estándar para incrementar la estabilidad del compuesto oligomérico resultante en fluidos biológicos, por ejemplo, aumentando la resistencia hacia las nucleasas (endonucleasas y
20 exonucleasas). El grado de estabilidad depende del número de monómeros de ANB usados, de su posición en el oligonucleótido y del tipo de monómero de ANB usado. En comparación con el ADN y los fosforotioatos, se puede establecer el siguiente orden de capacidad para estabilizar un oligonucleótido frente a la degradación nucleolítica: ADN << fosforotioatos ~ oxi-ANB < α -L-ANB < amino-ANB < tio-ANB.

25 Dado el hecho de que el ANB es compatible con la síntesis de ADN estándar y que se mezcla libremente con muchos análogos de ácidos nucleicos existentes, la resistencia a las nucleasas de los compuestos oligoméricos con ANB se puede potenciar adicionalmente de acuerdo con la invención incorporando otros análogos que muestren una estabilidad incrementada frente a las nucleasas o bien explotando los enlaces internucleosídicos resistentes a las
30 nucleasas, por ejemplo, los enlaces de fosforomonotioato, fosforoditioato y metilfosfonato, etc.

Modo de acción: los compuestos antisentido descritos en la solicitud pueden ejercer su acción terapéutica por medio de una diversidad de mecanismos y pueden ser capaces de combinar varios de ellos en el mismo compuesto. En un
escenario, la unión del oligonucleótido a su diana (pre-ARNm o ARNm) actúa para prevenir la unión de otros factores (proteínas, otros ácidos nucleicos, etc.) necesarios para la adecuada función de la diana, es decir, actúa
35 mediante impedimento estérico. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido se puede unir a motivos de secuencia del pre-ARNm o ARNm que son importantes para el reconocimiento y la unión de factores transaccionales implicados en el empalme, la poliadenilación, el transporte celular, las modificaciones postranscripcionales de nucleósidos en el ARN, la protección del extremo 5', la traducción, etc. En el caso del empalme del pre-ARNm, el resultado de la interacción entre el oligonucleótido y su diana puede ser la supresión de la expresión de una proteína no deseada, la
40 generación de ARNm empalmado alternativo que codifique una proteína deseada o ambas. En otro modo de realización, la unión del oligonucleótido a su diana desactiva el proceso de traducción creando un bloqueo físico en la maquinaria ribosómica, es decir, la detención de la traducción.

45 En otro modo de realización más, la unión del oligonucleótido a su diana interfiere con la capacidad de los ARN de adoptar estructuras secundarias y de orden superior que son importantes para su adecuada función, es decir, interferencia estructural. Por ejemplo, el oligonucleótido puede interferir con la formación de estructuras de horquilla que desempeñan papeles decisivos en diferentes funciones, tales como proporcionar estabilidad adicional al ARN o adoptar motivos de reconocimiento esenciales para diferentes proteínas.

50 En todavía otro modo de realización más, la unión del oligonucleótido inactiva la diana para procesos metabólicos celulares adicionales incorporando enzimas celulares que degradan el ARNm. Por ejemplo, el oligonucleótido puede comprender un segmento de nucleósidos que tenga la capacidad de incorporar ribonucleasa H (ARNasaH), que degrada la parte de ARN de un dúplex ADN/ARN. Asimismo, el oligonucleótido puede comprender un segmento que incorpore ARNsas bicatenarias, tales como, por ejemplo, ARNasa III o puede comprender una secuencia guía
55 externa (EGS) que incorpore una enzima endógena (ARNasa P) que degrade el ARNm diana. Además, el oligonucleótido puede comprender un motivo de secuencia que presente actividad catalítica de ARNasa o se pueden fijar restos a los oligonucleótidos que, cuando se acercan a la diana por el acontecimiento de hibridación, desactiven las actividades metabólicas adicionales de la diana.

60 Se ha demostrado que β -D-oxi-ANB no tolera la actividad de ARNasaH. Sin embargo, esto se puede cambiar de acuerdo con la invención creando oligonucleótidos quiméricos compuestos de β -D-oxi-ANB y ADN, llamados "gápmeros". Un "gápmero" se basa en un tramo central de ADN de 4-12 nucleótidos o monómeros modificados reconocibles y escindibles por la ARNasaH (el hueco) típicamente flanqueado por de 1 a 6 residuos de β -D-oxi-ANB (los flancos). Los flancos también se pueden construir con derivados de ANB. Existen otras construcciones
65 quiméricas de acuerdo con la invención que son capaces de actuar por medio de un mecanismo mediado por ARNasaH. Un "headmero" se define por un tramo contiguo de derivados de ANB o β -D-oxi-ANB en el extremo 5'

seguido de un tramo contiguo de ADN o monómeros modificados reconocibles y escindibles por la ARNasaH hacia el extremo 3', y un "tailmero" se define por un tramo contiguo de ADN o monómeros modificados reconocibles y escindibles por la ARNasaH en el extremo 5' seguido de un tramo contiguo de derivados de ANB o β -D-oxi-ANB hacia el extremo 3'. Otras quimeras de acuerdo con la invención, llamadas "míxmeros", que consisten en una composición alternativa de ADN o monómeros modificados reconocibles y escindibles por la ARNasaH y derivados de ANB y/o β -D-oxi-ANB, también pueden ser capaces de mediar en la unión a y escisión por la ARNasaH. Puesto que el α -L-ANB incorpora actividad de ARNasaH hasta determinado grado, se pueden requerir huecos más pequeños de ADN o monómeros modificados reconocibles y escindibles por la ARNasaH para la construcción de los gápmers y se puede introducir más flexibilidad en la construcción de los míxmeros.

Propiedades farmacocinéticas

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

Como se menciona anteriormente, el ANB de acuerdo con la invención no es un compuesto químico único, sino varios compuestos químicos relacionados que, aunque son molecularmente diferentes, en conjunto presentan una asombrosa afinidad hacia ADN y ARN complementarios. De esta manera, la familia de compuestos químicos de ANB es adecuada de manera única para el desarrollo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención con propiedades farmacocinéticas adaptadas que explotan la alta afinidad de ANB para modular el tamaño de los compuestos activos o que explotan diferentes compuestos químicos de ANB para modular la composición molecular exacta de los compuestos activos. En el último caso, el uso de, por ejemplo, amino-ANB en lugar de oxi-ANB cambia la carga global del oligonucleótido y varía el comportamiento de captación y distribución. Asimismo, el uso de tio-ANB en lugar de oxi-ANB, incrementa la lipofilia del oligonucleótido y, de esta manera, influye en su capacidad para atravesar barreras lipófilas tales como, por ejemplo, la membrana celular.

La modulación de las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido de ANB de acuerdo con la invención se puede conseguir adicionalmente a través de la fijación de una diversidad de diferentes restos. Por ejemplo, la capacidad de los oligonucleótidos para atravesar la membrana celular se puede potenciar fijando, por ejemplo, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, un tioéter, una cadena alifática, un fosfolípido o una poliamina al oligonucleótido. Asimismo, la captación de oligonucleótidos de ANB en las células se puede potenciar conjugando restos al oligonucleótido que interacciona con moléculas de la membrana, mediando en el transporte en el citoplasma.

Propiedades farmacodinámicas

Las propiedades farmacodinámicas de acuerdo con la invención se pueden potenciar con grupos que mejoren la captación de oligómeros, potencien la bioestabilidad, tal como la resistencia potenciada de los oligómeros a la degradación, y/o incrementen la especificidad y afinidad de las características de hibridación de oligonucleótidos con la secuencia diana, por ejemplo, una secuencia de ARNm.

Toxicología

Existen básicamente dos tipos de toxicidad asociada a oligonucleótidos antisentido: toxicidad dependiente de la secuencia, que implica la secuencia de bases, y toxicidad independiente de la secuencia y relacionada con la clase. Con la excepción de las cuestiones relacionadas con la inmunoestimulación por parte de motivos de secuencia CpG naturales, las toxicidades que han sido las más prominentes en el desarrollo de los oligonucleótidos antisentido son independientes de la secuencia, por ejemplo, relacionadas con la química del oligonucleótido y relacionadas con la dosis, el modo, la frecuencia y la duración de la administración. La clase de fosforotioatos de los oligonucleótidos se ha caracterizado particularmente bien y se ha descubierto que ejerce una serie de efectos adversos, tales como la activación del complemento, un PTT (tiempo de tromboplastina parcial) prolongado, trombocitopenia, hepatotoxicidad (elevación de las enzimas hepáticas), cardiotoxicidad, esplenomegalia e hiperplasia de las células reticuloendoteliales.

Como se ha mencionado anteriormente, la familia de compuestos químicos de ANB proporciona una afinidad sin precedentes, una bioestabilidad muy alta y la capacidad de modular la composición molecular exacta del oligonucleótido. En un modo de realización de la invención, los compuestos que contienen ANB posibilitan el desarrollo de oligonucleótidos que combinan alta potencia con pocos enlaces de fosforotioato, si hubiera alguno, y que, por lo tanto, es probable que muestren una eficacia y seguridad mejores que los compuestos antisentido existentes.

Fabricación

Los oligo- y polinucleótidos de la invención se pueden producir usando las técnicas de polimerización de la química de ácidos nucleicos bien conocidas por un experto en la técnica de la química orgánica. En general, se usan los

ciclos de oligomerización estándar del enfoque de la fosforamidita (S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage y R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223), pero también se puede usar, por ejemplo, la química de H-fosfonato y de fosforotriéster.

- 5 Para algunos monómeros de la invención se usaron un tiempo de acoplamiento más largo y/o acoplamientos repetidos con reactivos recién preparados y/o reactivos de acoplamiento más concentrados.

Las fosforamiditas empleadas se acoplaron con rendimientos de acoplamiento por etapas satisfactorios de > 98 %. La tiolación del fosfato se realiza intercambiando la oxidación normal, por ejemplo, yodo/piridina/H₂O, usada en la síntesis de oligómeros de fosforodiéster por una oxidación que usa el reactivo de Beaucage (disponible comercialmente); otros reactivos de sulfurización también están comprendidos. Los oligómeros con ANB con fosforotioato se sintetizaron eficazmente con rendimientos de acoplamiento por etapas \geq 98 %.

10 Los oligonucleótidos de β -D-amino-ANB, β -D-tio-ANB, α -L-ANB y β -D-metilamino-ANB también se sintetizaron eficazmente con rendimientos de acoplamiento por etapas \geq 98 % usando los procedimientos de fosforamidita.

15 La purificación de los compuestos oligoméricos con ANB se realizó usando cartuchos desechables de purificación en fase inversa y/o HPLC de fase reversa y/o precipitación con etanol o butanol. Se usó electroforesis en gel, HPLC de fase inversa, EM-MALDI y EM-ESI para verificar la pureza de los oligonucleótidos sintetizados. Además, los materiales de soporte sólido que tienen inmovilizados a los mismos una nucleobase opcionalmente protegida y ANB opcionalmente protegido en 5'-OH son especialmente interesantes como material para la síntesis de compuestos oligoméricos que contienen ANB, en los que se incluye un monómero de ANB en el extremo 3'. En este caso, el material de soporte sólido es preferentemente CPG, por ejemplo, un material de CPG fácilmente (comercialmente) disponible o poliestireno en el que una nucleobase protegida opcionalmente funcionalizada en 3' y ANB opcionalmente protegido en 5'-OH se enlazan usando las condiciones establecidas por el proveedor de ese material particular.

Indicaciones

30 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede usar para el tratamiento de muchas enfermedades diferentes. Por ejemplo, se ha descubierto que HIF-1 α se sobreexpresa en diversos tumores humanos sólidos y en sus metástasis, por ejemplo, tumores de la mama, colon, próstata, páncreas, cerebro, pulmón, ovario, sistema gastrointestinal, cabeza y cuello, hígado, vejiga y el cuello uterino (Zhong, H. *et al.*, *Cancer Research* 59, 5830-5835, 1999; Talks, K.L. *et al.*, *American Journal of Pathology* 157(2), 411-421, 2000).

35 Los procedimientos de la invención se emplean preferentemente para el tratamiento o la profilaxis frente a enfermedades provocadas por cáncer, particularmente para el tratamiento del cáncer, que se puede producir en un tejido, tal como cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, páncreas, hígado, cerebro, testículos, estómago, intestino, médula espinal, senos nasales, cuello uterino, vías urinarias u ovarios.

40 Además, la invención descrita en el presente documento abarca un procedimiento para prevenir o tratar el cáncer que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto oligomérico que modula HIF-1 α , que incluye pero no está limitado a altas dosis del oligómero, a un ser humano que necesita dicho tratamiento. La invención abarca adicionalmente la administración durante un corto periodo de tiempo de un compuesto oligomérico que modula HIF-1 α . Las células normales, no cancerosas, se dividen en una frecuencia característica para el tipo de células particular. Cuando una célula se ha transformado a un estado canceroso, se produce una proliferación celular incontrolada y una muerte celular reducida, y, por lo tanto, la división celular o el crecimiento celular prolíficos son un sello de un tipo de células cancerosas. Los ejemplos de tipos de cáncer incluyen, pero no están limitados a, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia (por ejemplo, leucemia aguda, tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple), carcinoma de colon, carcinoma rectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma renal, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, cáncer cervicouterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral, cánceres de sitio primario no conocido, neoplasias, cánceres del sistema nervioso periférico, cánceres del sistema nervioso central, tumores (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma y retinoblastoma), enfermedad de las cadenas pesadas, metástasis o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por el crecimiento celular incontrolado o anómalo.

65

Composición farmacéutica

Se debe entender que la invención también se refiere a una composición farmacéutica, que comprende al menos una construcción de oligonucleótidos antisentido de la invención como ingrediente activo. Se debe entender que la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende opcionalmente un vehículo farmacéutico y que la composición farmacéutica comprende opcionalmente compuestos antisentido adicionales, compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivíricos y/o compuestos inmunomoduladores.

Sales

El compuesto oligomérico comprendido en la presente invención se puede emplear en una diversidad de sales farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, el término se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los compuestos identificados en el presente documento y presentan mínimos efectos toxicológicos no deseados. Los ejemplos no limitantes de dichas sales se pueden formar con sales de adición de bases y aminoácidos orgánicos formadas con cationes de metal, tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares o con un catión formado a partir de amoníaco, *N,N*-dibenciletilendiamina, *D*-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b); por ejemplo, una sal de tannato de cinc o similar.

Profármacos

En un modo de realización de la invención, el compuesto oligomérico puede estar en forma de un profármaco. Los oligonucleótidos son, en virtud, iones cargados negativamente. Debido a la naturaleza lipófila de las membranas celulares, la captación celular de oligonucleótidos se reduce en comparación con los equivalentes neutros o lipófilos. Este "impedimento" de polaridad se puede evitar usando el enfoque del profármaco (véase, por ejemplo, Crooke, R. M. (1998) en Crooke, S. T. *Antisense research and Application*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania, vol. 131, pp. 103-140). En este enfoque, los oligonucleótidos se preparan de una manera protegida, de modo que el oligonucleótido sea neutro cuando se administra. Estos grupos protectores están diseñados de tal manera que se puedan eliminar para que el oligonucleótido sea captado por las células. Los ejemplos de dichos grupos protectores son S-acetiltioetilo (SATE) o S-pivaloiltioetilo (*t*-butil-SATE). Estos grupos protectores son resistentes a las nucleasas y se eliminan selectivamente de manera intracelular.

Conjugados

En un modo de realización de la invención, el compuesto oligomérico se enlaza a ligandos/conjugados. De esta manera, se incrementa la captación celular de los oligonucleótidos antisentido. Esta conjugación puede tener lugar en las posiciones terminales 5'/3'-OH, pero los ligandos también pueden tener lugar en los azúcares y/o las bases. En particular, el factor de crecimiento al que se puede conjugar el oligonucleótido antisentido puede comprender transferrina o folato. Se pueden preparar complejos transferrina-polilisina-oligonucleótido o complejos folato-polilisina-oligonucleótido para su captación por células que expresan altos niveles del receptor de transferrina o folato. Otros ejemplos de conjugados/ligandos son restos de colesterol, intercaladores de dúplex, tales como acridina, poli-L-lisina, "protección de extremos" con uno o más grupos de enlace resistentes a nucleasas, tales como fosfomonotioato y similares.

La preparación de complejos de transferrina como vehículos de captación de oligonucleótidos en células se describe por Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990). La administración celular de conjugados folato-macromolécula mediante endocitosis mediada por receptor de folato, incluyendo la administración de un oligonucleótido antisentido, se describe por Low *et al.*, patente de EE. UU. 5.108.921. Véase también Leamon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5572 (1991).

Formulaciones

La invención también incluye la formulación de uno o más compuestos oligonucleotídicos como se divulga en el presente documento. Los agentes aglutinantes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden comprender parte del fármaco formulado. Las cápsulas, comprimidos y pastillas, etc., pueden contener, por ejemplo, los siguientes compuestos: celulosa microcristalina, goma o gelatina como aglutinantes; almidón o lactosa como excipientes; estearatos como lubricantes; diversos agentes edulcorantes o saborizantes. Para las cápsulas, la unidad de dosificación puede contener un vehículo líquido como aceites grasos. Asimismo, los recubrimientos de azúcar o agentes entéricos pueden formar parte de la unidad de dosificación. Las formulaciones de oligonucleótidos también pueden ser emulsiones de los ingredientes farmacéuticos activos y un lípido que forme una emulsión micelar.

Un oligonucleótido de la invención se puede mezclar con cualquier material que no afecte a la acción deseada, o con un material que complemente la acción deseada. Estos pueden incluir otros fármacos, incluyendo otros compuestos nucleosídicos.

Para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica o tópica, la formulación puede incluir un diluyente estéril,

tampones, reguladores de tonicidad y antibacterianos. El compuesto activo se puede preparar con vehículos que protejan frente a la degradación o eliminación inmediata del cuerpo, incluyendo implantes o microcápsulas con propiedades de liberación controlada. Para la administración intravenosa, los vehículos preferentes son solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato.

5 Preferentemente, se incluye un compuesto oligomérico en una formulación unitaria, tal como en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables, en una cantidad suficiente para la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz sin provocar efectos secundarios graves en el paciente tratado.

10 Administración

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área que se vaya a tratar. La administración puede ser (a) oral (b) pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, (c) tópica, incluyendo epidérmica, transdérmica, oftálmica y a través de las membranas mucosas, incluyendo administración vaginal y rectal; o (d) parenteral, incluyendo infusión o inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. En un modo de realización, el oligonucleótido activo se administra IV, IP, oral, tópica o como una inyección intravenosa rápida o se administra directamente en el órgano diana.

20 Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, pulverizaciones, supositorios, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, pulverulentas u oleosas, espesantes y similares. También puede ser útil el uso de guantes, preservativos recubiertos y similares. Las formulaciones tópicas preferentes incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se mezclan con un agente de administración tópica, tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen, pero no están restringidas a, polvos o granulado, microparticulados, nanoparticulados, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, pero no limitados a, potenciadores de la penetración, compuestos vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 Suministro

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una diversidad de componentes que incluyen, pero no están limitados a, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. El suministro del fármaco al tejido tumoral se puede potenciar mediante el suministro mediado por vehículos, incluyendo, pero no limitada a, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Dass CR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27).

45 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el(los) vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan mezclando uniforme y estrechamente los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y, entonces, si fuera necesario, conformando el producto.

50 Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de las muchas formas de dosificación posibles, tales como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

60 Combinación de fármacos

Los oligonucleótidos de la invención se pueden usar para anular los efectos de la inducción de HIF-1 α por hipoxia aguda inducida por el tratamiento de supresión de andrógenos en el cáncer de próstata.

65 Los oligonucleótidos de la invención también se pueden conjugar con sustancias farmacéuticas activas, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, una sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Los compuestos oligoméricos que contienen ANB son útiles para una serie de aplicaciones terapéuticas, como se indica anteriormente. En general, los procedimientos terapéuticos de la invención incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido con ANB modificado a un mamífero, particularmente un ser humano.

5 En un determinado modo de realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos antisentido y (b) uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales que funcionan mediante un mecanismo no antisentido. Cuando se usan con los compuestos de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar individualmente (por ejemplo, mitramicina y oligonucleótido),
10 secuencialmente (por ejemplo, mitramicina y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de otro agente y oligonucleótido) o en combinación con uno o más de dichos agentes quimioterapéuticos adicionales o en combinación con radioterapia. Todos los agentes quimioterapéuticos conocidos por un experto en la técnica se incorporan en el presente documento como tratamientos de combinación con el compuesto de acuerdo con la invención.

15 Los fármacos antiinflamatorios, incluyendo, pero no limitados a, fármacos antiinflamatorios no esteroides y corticoesteroides, fármacos antivíricos y fármacos inmunomoduladores, también se pueden combinar en las composiciones de la invención. Dos o más compuestos combinados se pueden usar conjunta o secuencialmente.

20 En otro modo de realización, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Dos o más compuestos combinados se pueden usar conjunta o secuencialmente.

25 **Dosificación**

La dosificación depende de la gravedad y el grado de respuesta de la enfermedad que se va a tratar, y del curso del tratamiento que dura desde varios días a varios meses, o hasta que se consiga una cura o una atenuación de la enfermedad. La pauta posológica óptima se pueden calcular a partir de las mediciones de la acumulación de
30 fármaco en el cuerpo del paciente.

Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales. En general, se puede estimar basándose en las CE_{50} que han resultado eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es desde 0,01 μ g a 1 g por kg de peso corporal, y se puede administrar una o más
35 veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 10 años o por infusión continua durante horas hasta varios meses. Las tasas de repetición para la dosificación se pueden estimar basándose en los tiempos de residencia y las concentraciones medidas del fármaco en tejidos o fluidos corporales. Después de un tratamiento con éxito, puede ser deseable que el paciente se someta a un tratamiento de mantenimiento para prevenir la recidiva de la enfermedad.

40 **Usos**

Los compuestos oligoméricos que contienen ANB de la presente invención se pueden utilizar como reactivos de investigación para el diagnóstico, el tratamiento y la profilaxis. En investigación, los oligonucleótidos antisentido se
45 pueden usar para inhibir específicamente la síntesis de los genes HIF-1 α en células y animales de laboratorio, facilitando así el análisis funcional de la diana o una valoración de su utilidad como diana para intervención terapéutica. En el diagnóstico, los oligonucleótidos antisentido se pueden usar para detectar y cuantificar la expresión de HIF-1 α en células y tejidos mediante inmunoelectrotransferencia, hibridación *in situ* o técnicas similares. Para el tratamiento, un animal o un ser humano que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno
50 que se puede tratar modulando la expresión de HIF-1 α se somete a tratamiento administrando compuestos antisentido de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, se proporcionan procedimientos de tratamiento de un animal, en particular, ratón y rata, y tratamiento de un ser humano que se sospecha que tienen o son propensos a tener una enfermedad o afección asociada a la expresión de HIF-1 α administrando una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos antisentido o composiciones de la invención

55 **Procedimientos**

Los procedimientos de la invención se emplean preferentemente para el tratamiento o profilaxis frente a enfermedades provocadas por una enfermedad. La solicitud describe un procedimiento de inhibición de la expresión
60 de HIF-1 α en células o tejidos, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con el compuesto de la invención, de modo que se inhiba la expresión de HIF-1 α . Además, en la solicitud se describe otro procedimiento de modulación de la expresión de un gen implicado en una enfermedad que comprende poner en contacto el gen o ARN del gen con un compuesto oligomérico en el que dicho compuesto tiene una secuencia que comprende al
65 menos una porción de 8 nucleobases de SEQ ID NO. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82,

83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 o 115, con lo que se modula la expresión génica. Estos compuestos pueden comprender una o más unidades de ANB. El compuesto se puede hibridar con ARN mensajero del gen para inhibir la expresión del mismo. Otro modo de realización es un procedimiento de tratamiento de un mamífero que padece o es susceptible de padecer una enfermedad oncológica, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido dirigido a HIF-1 α que comprende una o más unidades de ANB. Los procedimientos descritos se pueden dirigir a cánceres comunes, como, por ejemplo, cáncer primario y metastásico de mama, colorrectal, de próstata, de páncreas, otros cánceres GI, tumores en el pulmón, cervicouterinos, ováricos, cerebrales, en cabeza y cuello, en el cuello uterino, el colon, el hígado, la tiroides, el riñón, los testículos, el estómago, el intestino, el esófago, la médula espinal, los senos nasales, la vejiga o las vías urinarias, así como preeclampsia, enfermedad intestinal inflamatoria y enfermedad de Alzheimer. El procedimiento también puede modular la angiogénesis, así como la proliferación de glóbulos rojos, proliferación celular, metabolismo del hierro, metabolismo energético y de la glucosa, regulación del pH, invasión de tejidos, apoptosis, resistencia a múltiples fármacos, respuesta al estrés celular o metabolismo de la matriz, que comprende poner en contacto una célula con el compuesto antisentido que reivindica la invención de modo que se module la célula.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Síntesis de monómeros

La preparación de los monómeros mostrados en el Esquema 2, en los que Y y X son -O- y Z y Z* están -O- protegidos se describe en gran detalle en la referencia, Koshkin *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 8504-8512; Sørensen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124 (10), 2164-2176; Pedersen *et al.*, *Synthesis*, 2002, 6, 802-809 y las referencias encontradas en los mismos, en los que los grupos protectores de Z y Z* son respectivamente oxi-N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)fosforamidita y dimetoxitritiloxi. La preparación de monómeros del Esquema 2, en los que X es -O- e Y es -S- y -N(CH₃)- se describe en Rosenbohm *et al.* *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 655-663.

Ejemplo 2

Síntesis de oligonucleótidos de ANB

Todas las síntesis de oligonucleótidos se llevaron a cabo en una escala de 1 μ mol en una plataforma de instrumentos MOSS Expedite. Los procedimientos de síntesis se llevaron a cabo esencialmente como se describe en el manual del instrumento. Los monómeros de ANB usados se sintetizaron de acuerdo con Koshin A.A. *et al.* *J. Org. Chem.*, 2001, *66*, 8504-8512.

Preparación del hemiéster de succinilo de ANB

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

Preparación de la resina de ANB-CPG

El derivado hemiéster preparado anteriormente (90 μ mol) se disolvió en una cantidad mínima de DMF, se añadieron DIEA y pyBOP (90 μ mol) y se mezclaron entre sí durante 1 min. Esta mezcla preactivada se combinó con LCAA-CPG (500 Å, tamaño de malla 80-120, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó. Después de 1,5 h a temperatura ambiente, el soporte se separó por filtración y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Después del secado, se determinó la carga, y resultó ser de 57 μ mol/g.

Ciclos de fosfortioato

Se desprotegeron 5'-O-Dmt (A(bz), C(bz), G(ibu) y T) enlazados a CPG (vidrio de poro controlado) usando una solución de ácido tricloroacético al 3 % (v/v) en diclorometano. La resina se lavó con acetonitrilo. El acoplamiento de fosforamiditas (A(bz), G(ibu), 5-metil-C(bz)) o T- β -cianoetilfosforamidita se realizó usando una solución 0,08 M de la amidita 5'-O-Dmt-protegida en acetonitrilo y se realizó la activación usando DCI (4,5-dicianimidazol) en acetonitrilo (0,25 M). El acoplamiento se llevó a cabo en 2 minutos. La tiolación se llevó a cabo usando el reactivo de Beaucage (0,05 M en acetonitrilo) y se dejó reaccionar durante 3 minutos. El soporte se lavó exhaustivamente con acetonitrilo y se llevó a cabo la posterior protección usando una solución de anhídrido acético en THF (CAP A) y N-metilimidazol/piridina/THF (1:1:8) (CAP B) para proteger los grupos 5'-hidroxilo sin reaccionar. A continuación, se repitió la etapa de protección y se finalizó el ciclo mediante lavado con acetonitrilo.

Ciclos de ANB

Se desprotegió 5'-O-Dmt (locA(bz), locC(bz), locG(ibu) o locT) enlazado a CPG (vidrio de poro controlado) usando el mismo procedimiento que anteriormente. El acoplamiento se realizó usando 5'-O-Dmt (locA(bz), locC(bz), locG(ibu) o locT)-β-cianoetilfosforamida (0,1 M en acetonitrilo) y se realizó la activación mediante DCI (0,25 M en acetonitrilo).

5 El acoplamiento se prolongó durante 7 minutos. La protección se realizó usando anhídrido acético en THF (CAP A) y una solución de N-metilimidazol/piridina/THF (1:1:8) (CAP B) durante 30 s. El fosfito triéster se oxida al fosfato triéster más estable usando una solución de I₂ y piridina en THF durante 30 s. El soporte se lavó con acetonitrilo y se repitió la etapa de protección. El ciclo se finalizó con un lavado exhaustivo con acetonitrilo. Abreviaturas: Dmt: dimetoxitritilo y DCI: 4,5-dicianoimidazol.

10

Desprotección y escisión de oligonucleótidos

Los oligómeros se escindieron del soporte y el grupo protector de β-cianoetilo se eliminó tratando el soporte con NH₄OH al 35 % durante 1 h a temperatura ambiente. El soporte se separó por filtración y los grupos protectores de base se eliminaron elevando la temperatura a 65 °C durante 4 horas. La solución de oligonucleótidos se evaporó entonces a sequedad.

15

Purificación de oligonucleótidos

20 Los oligonucleótidos se purificaron mediante RP-HPLC (fase inversa) o AIE (intercambio aniónico).

RP-HPLC:

Columna: VYDAC™ ref. 218TP1010 (vydac)
Caudal: 3 ml/min
Tampón: A acetato de amonio 0,1 M pH 7,6
B acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo	0	10	18	22	23	28
% de B	0	5	30	100	100	0

IE:

Columna: Resource™ 15Q (amersham pharmacia biotech)
Caudal: 1,2 ml/min
Tampón: A NaOH 0,1 M
B NaOH 0,1 M, NaCl 2,0 M

Gradiente:

Tiempo	0	1	27	28	32	33
% de B	0	25	55	100	100	0

25

Abreviaturas

Dmt:	Dimetoxitritilo
DCI:	4,5-dicianoimidazol
DMAP:	4-dimetilaminopiridina
DCM:	Diclorometano
DMF:	Dimetilformamida
THF:	Tetrahidrofurano
DIEA:	N,N-diisopropiletilamina
PyBOP:	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
Bz:	Benzoílo
Ibu:	Isobutirilo
Beaucage:	3H-1,2-benzoditioil-3-ona-1,1-dióxido
A(bz), C(bz), G(ibu) o T:	Monómeros de ANB (ANB, ácido nucleico bloqueado)

Ejemplo 3. Cultivo celular

30 Los compuestos antisentido y su efecto sobre la expresión del ácido nucleico diana se pueden someter a prueba en cualquiera de una diversidad de tipos de células siempre que la proteína o ácido nucleico diana estén presentes en niveles medibles. Esto se puede determinar de manera rutinaria usando, por ejemplo, análisis por RT-PCR o Northern blot o Western blot. Los siguientes tipos de células se proporcionan con propósitos ilustrativos, pero se pueden usar de manera rutinaria otros tipos de células, siempre que la diana se exprese en el tipo de células elegido.

35

Las líneas celulares se cultivaron en el medio apropiado como se describe a continuación y se mantuvieron a 37 °C a un 95-98 % de humedad y un 5 % de CO₂. Las células se sometieron a pases de manera rutinaria 2-3 veces por

semana.

U87-MG: La línea celular de glioblastoma humana U87-MG se cultivó en medio de Eagle modificado (MEM) con sales de Earle y suero bovino fetal (FCS) al 10 %.

U373: La línea celular de glioblastoma humana U373 se cultivó en medio de Eagle modificado (MEM) con sales de Earle y suero bovino fetal (FCS) al 10 %.

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

Cultivo celular anaerobio: Para monitorizar los cambios en la expresión de HIF en condiciones de hipoxia, las células se cultivaron en condiciones anaerobias a un nivel de O₂ de un 0,1-1,5 % en una bolsa de incubación (Merck) con Anaerocult (Merck) añadido para unirse químicamente a O₂. Las condiciones anaerobias se obtuvieron en 1-2 horas. Las células se sometieron a anoxia durante 6 o 18 horas.

Ejemplo 4

Tratamiento con el oligonucleótido antisentido

Las células (descritas anteriormente) se trataron con oligonucleótido usando la formulación de liposomas catiónicos LipofectAMINE 2000 (Gibco) como vehículo de transfección. Las células se sembraron en placas de Petri de cultivo celular de 100 mm x 20 mm (Corning) o placas de 6 pocillos (NUNC) y se trataron cuando la confluencia fue de un 90 %. Las concentraciones de oligonucleótido usadas variaban desde 1 nM a 400 nM de concentración final. La formulación de complejos oligonucleótido-lípido se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando MEM libre de suero y una concentración final de lípidos de 5 µg/ml en 6 ml de volumen total. Las células se incubaron a 37°C durante 4 o 24 horas y se detuvo el tratamiento por eliminación del medio de cultivo que contenía oligonucleótidos. Se lavaron las células y se añadió MEM que contenía suero. Después del tratamiento con el oligonucleótido, se dejó que las células se recuperaran durante 18 horas antes de que se sometieran a anoxia durante 6 horas o bien se sometieron directamente a anoxia durante 18 horas.

Ejemplo 5

Extracción del ARN total

El ARN total se aisló usando el minikit RNeasy (por ejemplo, ref. 74104 de Qiagen) o bien usando el reactivo Trizol (por ejemplo, ref. 15596 de Life technologies). Para el aislamiento de ARN a partir de líneas celulares, RNeasy es el procedimiento preferente; para muestras de tejido, Trizol es el procedimiento preferente. El ARN total se aisló a partir de líneas celulares usando el minikit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Las muestras de tejido se homogeneizaron usando un homogeneizador Ultra Turrax T8 (por ejemplo, IKA Analysen technik) y se aisló el ARN total usando el protocolo del reactivo Trizol proporcionado por el fabricante.

Ejemplo 6

Síntesis de ADNc de primera cadena

La síntesis de primera cadena se realizó usando el kit OmniScript Reverse Transcriptase (ref. 205113, Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para cada muestra, se ajustaron 0,5 µg de ARN total a 12 µl cada uno con H₂O libre de ARNasa y se mezclaron con 2 µl de poli(dT)₁₂₋₁₈ (2,5 µg/ml) (Life Technologies, Gibco BRL, Roskilde, DK), 2 µl de mezcla de dNTP (5 mM cada dNTP), 2 µl 10x tampón RT, 1 µl de INHIBIDOR de ARNasa RNAGuard™ (33,3 U/ml), (ref. 27-0816-01, Amersham Pharmacia Biotech, Horsholm, DK) y 1 µl de OmniScript Reverse Transcriptase (4 U/µl) seguido de incubación a 37 °C durante 60 minutos e inactivación por calor de la enzima a 93 °C durante 5 minutos.

Ejemplo 7

Análisis de la modulación antisentido de la expresión de HIF-1α

La modulación antisentido de la expresión de HIF-1α se puede someter a ensayo en una diversidad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm de HIF-1α se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, el análisis por Northern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real. En la actualidad es preferente la PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN se puede realizar sobre ARNm o ARN celular total.

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

5 El análisis cuantitativo en tiempo real (PCR) se puede lograr convenientemente usando el sistema de detección por PCR en tiempo real iQ Multi-Color, disponible comercialmente en BioRAD.

Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm de Ha-ras

10 La cuantificación de los niveles de ARNm se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección por PCR en tiempo real iQ Multi-Color (BioRAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

15 La mezcla maestra de PCR Platinum Quantitative PCR SuperMix UDG 2x se obtuvo de la ref. 11730 de Invitrogen. Los cebadores y las sondas de TaqMan® se obtuvieron de MWG-Biotech AG, Ebersberg, Alemania.

20 Las sondas y los cebadores para HIF-1α humano se diseñaron para que se hibridaran a una secuencia Ha-ras humana usando la información de secuencia publicada (número de acceso a GenBank NM_001530, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO. 1).

Para el HIF-1α humano, los cebadores de PCR fueron:

25 cebador directo: 5'-CTCATCCAAGAAGCCCTAACGTGTT-3' (concentración final en el ensayo: 0,9 μM) (SEQ ID NO. 116),; cebador inverso: 5'-GCTTTCTCTGAGCATTCTGCAAAGC-3' (concentración final en el ensayo: 0,9 μM) (SEQ ID NO. 117) y la sonda de PCR fue: 5'-FAM-CCTCAGGAAGTGTAGTTCTTGGACTCAAAGCGACA-TAMRA-3' (concentración final en el ensayo: 0,1 μM) (SEQ ID NO. 118).

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

35 El contenido de muestra de ARNm de GAPDH humana se cuantificó usando el reactivo de ensayo de GAPDH humana ABI Prism Pre-Developed TaqMan (ref. 4310884E de Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Para la cuantificación de ARNm de GAPDH de ratón, se diseñaron los siguientes cebadores y sondas: cebador sentido 5'-aaggctgtgggcaaggctcatc-3' (concentración final de 0,3 μM), cebador antisentido 5'-aaggctgtgggcaaggctcatc-3' (concentración final de 0,6 μM), sonda de TaqMan 5'-FAM-gaagctcactggcatggcatggccttcggttc-TAMRA-3' (concentración final de 0,2 μM).

PCR en tiempo real

45 El ADNc de la síntesis de primera cadena realizada como se describe en el ejemplo 8 se diluyó 2-20 veces y se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los cebadores y la sonda se mezclaron con 2 x Platinum Quantitative PCR SuperMix UDG (ref. 11730, Invitrogen) y se añadieron a 3,3 μl de ADNc hasta un volumen final de 25 μl. Cada muestra se analizó por triplicado. El ensayo de diluciones de 2 veces de un ADNc que se había preparado sobre material purificado a partir de una línea celular que expresaba el ARN de interés generó curvas estándar para los ensayos. Se usó H₂O estéril en lugar de ADNc para el control sin molde. Programa de PCR: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95 °C, 15 segundos, 60 °C, 1 minuto.

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

Ejemplo 8

Análisis por Western blot de los niveles de proteína HIF-1α

60 Los niveles de proteína de HIF-1α se pueden cuantificar de una diversidad de formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis por Western blot (inmunotransferencia), ELISA, RIA (radioinmunoensayo) o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a HIF-1α se pueden identificar y obtener a partir de una diversidad de fuentes, tales como Upstate Biotechnologies (Lake Placid, EE. UU.), Novus Biologicals (Littleton, Colorado, EE. UU.), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EE. UU.) o se pueden preparar mediante procedimientos de generación de anticuerpos convencionales.

65 Para medir el efecto del tratamiento con los oligonucleótidos antisentido frente a HIF-1α, se determinaron los niveles

de proteína de HIF-1 α en células tratadas y no tratadas usando Western blot.

Después del tratamiento con el oligonucleótido como se describe anteriormente, se obtuvieron las células raspando con una varilla de vidrio en solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo que contenía 0,37 mg/ml del inhibidor de proteasa fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

Las células obtenidas se lavaron en 1 ml de PBS que contenía PMSF como se describe anteriormente y los sedimentos celulares se mantuvieron congelados a -80 °C.

Para la extracción de proteínas, se disolvieron los sedimentos celulares congelados en 3 volúmenes de tampón de lisis enfriado con hielo (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet P 40 (NP-40) al 1 %, SDS al 0,1 %, desoxicolato de sodio al 1 % (p/v), ditiotreitól (DTT) 1 mM, combinación completa inhibidora de proteínas (Boehringer Mannheim)). Las muestras se sometieron a ultrasonidos 2-3 veces durante 5-10 segundos en un homogeneizador ultrasónico Vibra Cell 50 (Sonics & Materials Inc.). El lisado se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior.

La concentración de proteínas del lisado de proteínas se determinó usando el kit de ensayo BCA Protein (Pierce) como describe el fabricante.

Electroforesis en gel con SDS:

Las muestras de proteínas preparadas como se describe anteriormente se descongelaron sobre hielo y se desnaturalizaron a 70 °C durante 10 min.

Las muestras se cargaron sobre 1,0 mm de gel NuPage Bis-Tris al 10 % (NOVEX) y los geles se hicieron migrar en tampón de migración, tampón de migración NuPage MES SDS o bien tampón de migración NuPage MOPS SDS (ambos de NOVEX) dependiendo de la separación deseada de las proteínas en un módulo de electroforesis de micélulas Xcell II (NOVEX).

En la cámara interna del módulo de electroforesis se añadió antioxidante NuPage (NOVEX) al tampón de migración a una concentración final de 2,5 μ l/ml. Para la referencia de tamaños, se cargó en el gel SeeBlue Plus2 Prestained Standard (Invitrogen). La electroforesis se ejecutó a 160 V durante 2 horas.

Electrotransferencia semiseca:

Después de la electroforesis, las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) mediante electrotransferencia semiseca. El gel se equilibró en tampón de transferencia NuPage (NOVEX) hasta la electrotransferencia. El procedimiento de electrotransferencia se llevó a cabo en una célula de transferencia semiseca Trans-blot SD (BioRAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La membrana se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior.

Inmunodetección:

Para detectar la proteína deseada, la membrana se incubó con anticuerpos policlonales o monoclonales frente a la proteína. La membrana se bloqueó en tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 2,5 % y BSA al 5 % disueltos en tampón TS (NaCl 150 mM, base Tris 10 mM, pH 7,4)) durante 1 hora con agitación. Entonces, la membrana se lavó 2 x 15 min en tampón TS a temperatura ambiente y se incubó durante la noche con anticuerpo primario en tampón TS-Tween20 con NaN₃ al 0,1 % a 4 °C. Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales primarios y concentraciones/diluciones: anti-Glut1 de ratón (de T. Ploug, The Panum Institute, Copenhagen, Dinamarca) 1:20, 1 μ g/ml anti-HIF-1 α de ratón (H72320, Transduction Laboratories), anti- α -tubulina de ratón (T-9026, Sigma) 1:10.000. Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó en tampón TS-Tween20 durante 15 minutos seguido de 2 lavados adicionales de 5 minutos cada uno con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario, anticuerpo policlonal caprino anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa (P0447, DAKO A/S) durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, la membrana se lavó en tampón TS-Tween20 durante 15 minutos seguido de 3 lavados adicionales durante 5 minutos cada uno con agitación a temperatura ambiente. Después del último lavado, la membrana se incubó con ECL⁺ Plus (Amersham) durante 5 minutos seguido de una exploración inmediata con un STORM 840 (Molecular Dynamics Inc.). La membrana se deshidró en tampón de deshidridación (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS al 2 %, base Tris 62,5 mM) a pH 6,7 por incubación con baja agitación durante 30 minutos a 50 °C. Después de lavar en tampón TS-Tween20 durante 2 x 10 minutos a temperatura ambiente, la membrana se secó y se selló en una bolsa de plástico y se almacenó a 4 °C. Los niveles de expresión de proteínas se cuantificaron en relación con la expresión de una proteína constitutiva usando el software Image Quant, versión 5,0 (Molecular Dynamics Inc).

Ejemplo 9

65 Inhibición antisentido de la expresión de HIF-1 α humano por oligonucleótidos

De acuerdo con la presente invención, se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigirse a diferentes regiones del ARN de HIF-1 α humano, usando secuencias publicadas (número de acceso a GenBank NM_001530, incorporado en el presente documento como SEQ ID NO. 1 y Figura 7). Los oligonucleótidos de 16 nucleótidos de longitud se muestran en la Tabla 1 y tienen un SEQ ID NO. Los oligonucleótidos están diseñados para que sean particularmente potentes como oligonucleótidos antisentido, particularmente cuando se sintetizan usando nucleótidos artificiales tales como ANB o fosforotioatos, etc. El "sitio diana" indica el primer número de nucleótido en la secuencia diana particular a la que se une el oligonucleótido. Los compuestos se analizaron en cuanto a sus efectos sobre los niveles de proteína HIF-1 α mediante análisis por Western blot como se describe en otros ejemplos en el presente documento.

Tabla 1. Inhibición de los niveles de proteína HIF-1 α humana por oligonucleótidos antisentido

SEQ ID NO./n.º Cureon	% de inhibición de oligonucleótido 100 nM	Sitio diana	Secuencia oligonucleotídica 5'-3'	Diseño de oligonucleótidos 5'-3'
SEQ ID NO. 2/2651	92	234	GCGATGTCTTCACGGC	G _s C _s G _s A _s t _s g _s t _s C _s t _s t _s C _s a _s C _s G _s G _s C
SEQ ID NO. 3/2627	94	2256	TGGTGAGGCTGTCCGA	T _s G _s G _s T _s g _s a _s g _s g _s C _s t _s g _s t _s C _s C _s G _s A
SEQ ID NO. 4		251	ATGGTGAATCGGTCCC	
SEQ ID NO. 5		250	TGGTGAATCGGTCCCC	
SEQ ID NO. 6		49	AGGTGGCTTGT CAGGG	
SEQ ID NO. 7		231	ATGTCTTCACGGC GGG	
SEQ ID NO. 8		233	CGATGTCTTCACGGCG	
SEQ ID NO. 9		2017	GGCTTGCGGAACTGCT	
SEQ ID NO. 10		1471	TTGTGTCTCCAGCGGC	
SEQ ID NO. 11		6	CGAAGAGAGTGCTGCC	
SEQ ID NO. 12/2654	96	153	AGGCAAGTCCAGAGGT	A _s G _s G _s C _s a _s a _s g _s t _s C _s C _s a _s g _s A _s G _s G _s T
SEQ ID NO. 13		1937	GCTAACATCTCCAAGT	
SEQ ID NO. 14		1965	GAAGTCATCATCCATT	
SEQ ID NO. 15		1744	GTGTCTGATCCTGAAT	
SEQ ID NO. 16		1821	ATCCACATAAAAAACAA	
SEQ ID NO. 17		2050	CTGTAAGTGTGCTTTG	
SEQ ID NO. 18		2182	TAGGAGATGGAGATGC	
SEQ ID NO. 19		2317	CGTTAGGGCTTCTTGG	
SEQ ID NO. 20		2506	TCCAAGAAAGTGATGT	
SEQ ID NO. 21		2621	CCACTTTCATCCATTG	
SEQ ID NO. 22/2655	93	2680	TTCTGCTGCCTTGTAT	T _s T _s C _s T _s g _s C _s t _s g _s C _s C _s t _s t _s G _s T _s A _s T
SEQ ID NO. 23/2656	93	2783	TTTAGGTAGTGAGCCA	T _s T _s T _s A _s g _s g _s t _s a _s g _s t _s g _s a _s G _s C _s C _s A
SEQ ID NO. 24		2837	GCAGTATTGTAGCCAG	
SEQ ID NO. 25		3067	TATTGGCATCTTCTTA	
SEQ ID NO. 26		3100	TGATGAAAGGTTACTG	
SEQ ID NO. 27		3169	GGCAAAGCATTATTAT	
SEQ ID NO. 28		3356	AACCATACAGCATTTA	
SEQ ID NO. 29		3360	AATAAACCATACAGCA	
SEQ ID NO. 30		3426	TGCCACATACCTTCTA	
SEQ ID NO. 31		3437	ATCCAAATAAATGCCA	
SEQ ID NO. 32		3531	CATAAACTTCCACAAC	
SEQ ID NO. 33		170	GCGGAGAAGAGAAGGA	
SEQ ID NO. 34		3582	CCAACAGGGTAGGCAG	
SEQ ID NO. 35		3704	AATAGCGACAAAGTGC	
SEQ ID NO. 36		3845	AACCACAAAGAGCAAA	
SEQ ID NO. 37		2369	TTTAGTTCTTCTCAG	
SEQ ID NO. 38		2848	ACCAAGTTTGTGCAGT	
SEQ ID NO. 38		2413	TTTTTCGCTTCTCTG	
SEQ ID NO. 40		2919	CAGCATTAAGAACAT	
SEQ ID NO. 41		2986	AAAATGATGCTACTGC	
SEQ ID NO. 42		2720	TGATCCAAAGCTCTGA	
SEQ ID NO. 43		286	TCTTTTCTTGTGCTT	

ES 2 649 817 T3

SEQ ID NO./n. Cureon	% de inhibición de oligonucleót ido 100 nM	Sitio diana	Secuencia oligonucleotídica 5'-3'	Diseño de oligonucleótidos 5'-3'
SEQ ID NO. 44		3032	ATAAACTCCCTAGCCA	
SEQ ID NO. 45		3228	GTAAGTCTGGTATTT	
SEQ ID NO. 46		3299	TAACAATTTTCATAGGC	
SEQ ID NO. 47		3490	GCTGGCAAAGTACTA	
SEQ ID NO. 48		3610	TTTACAGTCTGCTCAA	
SEQ ID NO. 49		3677	CATTGTATTTTGAGCA	
SEQ ID NO. 50		3786	TTTACTGTGACAATA	
SEQ ID NO. 51		3874	AACAAAACAATACAGT	
SEQ ID NO. 52		384	TGGCAACTGATGAGCA	
SEQ ID NO. 53/2657	87	479	TCACCAGCATCCAGAA	T _s C _s A _s C _s C _s a _s g _s C _s a _s t _s C _s A _s G _s A _s A
SEQ ID NO. 54/2658	84	917	ATCAGCACCAAGCAGG	A _s T _s C _s A _s g _s C _s a _s C _s C _s a _s g _s C _s A _s G _s G
SEQ ID NO. 55/2659	95	1177	TGGCAAGCATCCTGTA	T _s G _s G _s C _s a _s a _s g _s C _s a _s t _s C _s T _s G _s T _s A
SEQ ID NO. 56/2660	93	1505	TCTGTGTCGTTGCTGC	T _s C _s T _s G _s t _s g _s t _s C _s g _s t _s g _s C _s T _s G _s C
SEQ ID NO. 57		2095	TGGTGGCATTAGCAGT	
SEQ ID NO. 58		2116	CATCAGTGGTGGCAGT	
SEQ ID NO. 59/2661	86	2223	TGGTGTGATGTGGCA	
SEQ ID NO. 60/2662	79	2477	TCGTCTGGCTGCTGTA	T _s G _s G _s T _s g _s a _s t _s g _s a _s t _s g _s t _s G _s G _s C _s A
SEQ ID NO. 61/2663	85	2553	TTGCTCCATTCCATTC	T _s C _s G _s T _s C _s t _s g _s g _s C _s t _s g _s C _s T _s G _s T _s A
SEQ ID NO. 62		98	AAGCGGGCGGCAATCG	T _s T _s G _s C _s t _s C _s C _s a _s t _s C _s A _s T _s T _s C
SEQ ID NO. 63		349	ATTCTTTACTTCGCCG	
SEQ ID NO. 64		412	CAAGATGCGAACTCAC	
SEQ ID NO. 65		516	ATTCATCTGTGCTTTC	
SEQ ID NO. 66		574	TGTCACCATCATCTGT	
SEQ ID NO. 67		747	GCTTCGCTGTGTGTTT	
SEQ ID NO. 68		638	TGTCCAGTTAGTTCAA	
SEQ ID NO. 69		700	TGTGTGTAAGCATTTC	
SEQ ID NO. 70		809	GCAGACTTTATGTTCA	
SEQ ID NO. 71		871	GTTGGTTACTGTTGGT	
SEQ ID NO. 72		968	TTGCTATCTAAAGGAA	
SEQ ID NO. 73		1104	ATCAGAGTCCAAAGCA	
SEQ ID NO. 74		1057	GTTCTTCTGGCTCATA	
SEQ ID NO. 75		1003	ATTTTCATATCCAGGCT	
SEQ ID NO. 76		1163	TACTGTCCCTGTGGTGA	
SEQ ID NO. 77		1221	TATGACAGTTGCTTGA	
SEQ ID NO. 78		1284	AATACCACTCACAACG	
SEQ ID NO. 79		1322	TCTGTTTGTGAAGGG	
SEQ ID NO. 80		1383	AACTTTGGTGAATAGC	
SEQ ID NO. 81		1440	TAAAGCATCAGGTTCC	
SEQ ID NO. 82		1559	GGGAGCATTACATCAT	
SEQ ID NO. 83		1613	GTGGGTAATGGAGACA	
SEQ ID NO. 84		1669	CTTCTTGATTGAGTGC	
SEQ ID NO. 85		1702	GTGACTCTGGATTTGG	
SEQ ID NO. 86		1783	CAGGTGAACTTTGTCT	
SEQ ID NO. 87		1804	ATTCAC TGGGACTATT	
SEQ ID NO. 88		1887	TGCTTCTGTGTCTTCA	
SEQ ID NO. 114/Cur2652	97	3091	GTTACTGCCTTCTTAC	G _s T _s T _s A _s C _s t _s g _s C _s C _s t _s C _s T _s T _s A _s C
SEQ ID NO. 115/Cur2653	90	293	CCGGCGCCCTCCATGG	C _s C _s G _s G _s C _s g _s g _s C _s C _s C _s t _s C _s A _s T _s G _s G

Son preferentes las secuencias que demostraron una inhibición de la expresión de HIF-1 α de al menos un 20 % en este experimento (véanse también las Figuras 1-9). Los sitios diana que son complementarios de estas secuencias preferentes se denominan en el presente documento "puntos calientes" y, por lo tanto, son sitios preferentes para que los compuestos de la presente invención se dirijan a ellos.

Ejemplo 10

Inhibición antisentido de HIF-1 α por fosforotioato, oligonucleótidos que contienen ANB u oligonucleótidos quiméricos que tienen al menos un segmento de ANB y al menos un segmento de fosforotioato

De acuerdo con la presente invención, también se sintetizó una segunda serie de oligonucleótidos antisentido (Tabla 2). Estas series de compuestos son oligonucleótidos de fosforotioato modificados completamente, oligonucleótidos de ANB modificados completamente u oligonucleótidos quiméricos de 16 nucleótidos de longitud dirigidos a dos sitios diferentes. Los oligonucleótidos quiméricos son un "gápmero" (GM), "headmero" (WM5) o "tailmero" (WM3) compuestos por una región que consiste en fosforotioatos (P=S) que está flanqueada en uno o ambos lados por un segmento de ANB. Estos segmentos están compuestos de nucleótidos oxi-ANB. Algunos de los oligonucleótidos también tenían un color fluorescente (FAM) incorporado. También se diseñaron oligonucleótidos con emparejamiento erróneo (MM). Todas las citosinas en oxi-ANB están metiladas en la posición C5 de las nucleobases. Los compuestos se analizaron en cuanto a su efecto sobre los niveles de proteína HIF-1 α mediante Western blot como se describe en otros ejemplos en el presente documento. El "sitio diana" indica el primer número de nucleótido en la secuencia diana particular a la que se une el oligonucleótido.

Tabla 2. Inhibición de los niveles de proteína HIF-1 α humana por oligonucleótidos con fosforotioato, oligonucleótidos que contienen ANB u oligonucleótidos quiméricos que tienen uno o dos segmentos de ANB y un segmento de fosforotioato (el enlace de cadena principal es P=0 a menos que se indique lo contrario, s: enlace P=S, letras minúsculas, ácido desoxinucleico, letras mayúsculas, oxi-ANB).

Denominación	SEQ NO.	% de inhibición de oligonucleótido 100 nM	Sitio diana y diseño	Secuencia y diseño 5'-3'
Cur0805	SEQ ID 89	24	234 FM	GCGATGTCTTCACGGC
Cur0806	SEQ ID 90	21	234 PS	g _s c _s g _s a _s t _s g _s t _s c _s t _s c _s a _s c _s g _s g _s c
Cur0807	SEQ ID 91		234 GM	GCGA _s t _s g _s t _s c _s t _s c _s a _s CGGC
Cur0808	SEQ ID 92		234 FAM	FAM-GCGA _s t _s g _s t _s c _s t _s c _s a _s CGGC
Cur0809	SEQ ID 93	34	234 WM5	GCGATGTC _s t _s c _s a _s c _s g _s g _s c
Cur0810	SEQ ID 94	54	234 WM3	g _s c _s g _s a _s t _s g _s t _s c _s TTCACGGC
Cur0811	SEQ ID 95	24	2256 FM	TGGTGAGGCTGTCCGA
Cur0812	SEQ ID 96		2256 PS	t _s g _s g _s t _s g _s a _s g _s g _s c _s t _s g _s t _s c _s c _s g _s a
Cur0813	SEQ ID 97	86	2256 GM	TGGT _s g _s a _s g _s g _s c _s t _s g _s t _s CCGA
Cur0814	SEQ ID 98		2256 FAM	FAM-TGGT _s g _s a _s g _s g _s c _s t _s g _s t _s CCGA
Cur0815	SEQ ID 99		2256 WM5	TGGTGAGG _s c _s t _s g _s t _s c _s g _s a
Cur0816	SEQ ID 100	37	2256 WM3	t _s g _s g _s t _s g _s a _s g _s g _s CTGTCCGA
Cur0959	SEQ ID 101		234 MM1	GCGA _s c _s t _s c _s t _s c _s a _s GGGC
Cur0960	SEQ ID 102		234 MM2	GCGT _s g _s t _s c _s a _s t _s c _s a _s CGGC
Cur0961	SEQ ID 103		2256 MM1	TGGT _s g _s a _s g _s c _s t _s g _s t _s CGGA
Cur0962	SEQ ID 104		2256 MM2	TGCT _s g _s a _s g _s g _s t _s g _s t _s CGGA
Cur2627	SEQ ID 3	94	2256 GM	T _s G _s G _s T _s g _s a _s g _s g _s c _s t _s g _s t _s C _s C _s G _s A
Cur2628	SEQ ID 105	95	2256 GM	T _s G _s G _s t _s g _s a _s g _s g _s c _s t _s g _s t _s C _s C _s G _s a
Cur2629	SEQ ID 106	96	2256 GM	T _s G _s G _s t _s g _s a _s g _s g _s c _s t _s g _s t _s C _s C _s G _s a
Cur2630	SEQ ID 107	95	2256 GM	T _s G _s G _s T _s g _s a _s g _s g _s c _s t _s g _s t _s C _s C _s G _s a

Cur2631	SEQ ID 108	95	2256 GM	T _s G _s G _s T _s G _s A _s g _s g _s C _s t _s g _s t _s C _s g _s a
Cur2632	SEQ ID 109	94	2256 GM	TGGt _s g _s a _s g _s g _s C _s t _s g _s t _s CCGa
Cur2633	SEQ ID 110	94	2256 GM	TGGt _s g _s a _s g _s g _s C _s t _s g _s t _s CCGa
Cur2634	SEQ ID 111	91	2256 GM	TGGTg _s a _s g _s g _s C _s t _s g _s t _s CCGa
Cur2635	SEQ ID 112	94	2256 WM5	TGGTGA _s g _s C _s t _s g _s t _s C _s g _s a
Cur2412	SEQ ID 113		2256 GM	TGGT _s g _s a _s g _s g _s ^m C _s t _s g _s t _s CCGa

5 Como se muestra en la Tabla 2 y las Figuras 1-6, la mayor parte de los SEQ ID NO. 89-104 demostraron al menos un 20 % de inhibición de la expresión de HIF-1 α en este experimento y, por lo tanto, son preferentes. Los sitios diana que son complementarios de estas secuencias preferentes se denominan en el presente documento "puntos calientes" y, por lo tanto, son sitios preferentes para que los compuestos de la presente invención se dirijan a ellos.

Ejemplo 11

Compuestos oligoméricos de eficacia *in vivo* dirigidos a HIF-1 α

10 El efecto del tratamiento con el oligonucleótido sobre el crecimiento de xenoinjertos tumorales en ratones atímicos se puede medir usando diferentes líneas celulares tumorales. Los ejemplos de dichas líneas celulares son las líneas celulares tumorales humanas U87 (glioblastoma), U373 (glioblastoma), 15PC3 (cáncer de próstata) y CPH 54A (carcinoma microcítico de pulmón) y la línea celular tumoral murina B16 (melanoma).

15 Tratamiento de xenoinjertos tumorales subcutáneos en ratones atímicos usando oligonucleótidos que contienen ANB.

20 Las células tumorales se implantaron de forma subcutánea y, entonces, se sometieron a pases en serie mediante tres trasplantes consecutivos. Se implantaron fragmentos tumorales de 1 mm de forma subcutánea con una aguja trócar en ratones atímicos NMRI. De forma alternativa, las células cancerosas, típicamente 10⁶ células suspendidas en 300 μ l de matrigel (BD Bioscience), se inyectaron subcutáneamente en los costados de los ratones atímicos NMRI.

25 Los ratones se trataron mediante inyección intraperitoneal o subcutánea de oligonucleótido a diversas dosis, con una dosis máxima de 5 mg/kg/día o mediante administración de hasta 5 mg/kg/día durante hasta 28 días usando bombas osmóticas ALZET implantadas de forma subcutánea. El tratamiento individual de los ratones comenzó cuando el volumen tumoral alcanzó 50 mm³. El tratamiento con PBS se inició cuando el volumen tumoral medio del grupo de control alcanzó 50 mm³. El experimento se terminó cuando los tumores de cualquier grupo alcanzaron los tamaños máximos permitidos. Los tamaños tumorales de todos los ratones se midieron diariamente mediante mediciones con calibre. El efecto del tratamiento se midió como la tasa de crecimiento tumoral y tamaño tumoral. Los ratones tratados con oligonucleótido se sacrificaron 24 horas después de la última inyección de oligonucleótido.

35 Al final del periodo de tratamiento, los ratones se anestesiaron y los tumores se extirparon y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para el análisis diana.

40 Resultados: Los ratones que portaban xenoinjertos tumorales de U373 se trataron con Cur813 (SEQ ID NO. 97) 5 mg/kg/día, i.p. x 1 vez al día durante 7 días o PBS 100 μ l/10 g/día, i.p. x 1 vez al día durante 7 días. Se trataron cinco ratones de cada grupo. La evaluación tumoral se llevó a cabo como se describe anteriormente. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 9.

Comparación de tamaños tumorales (prueba t)

45	Día	Valor de p
	4	0,0477
	5	0,0156
	6	0,0354
	7	0,0461

50 Análisis de Kaplan Meier:

Acontecimiento terminal: Tamaño tumoral 150 mm³:

Grupo n. ^o	Censurado	Mediana de	Supervivencia,
		acontecimientos	días

PBS	5	0	5	5
Cur813	5	1	4	7

Prueba de rango logarítmico para distribuciones de igualdad de supervivencia: $P = 0,0138$

5 **Tratamiento de xenoinjertos tumorales intracraneales en ratones atímicos usando oligonucleótidos que contienen ANB.**

10 Las células tumorales se implantaron intracranealmente en ratones atímicos NMRI y el tratamiento con el oligonucleótido se inició 1 semana después de la implantación. Los ratones se trataron mediante inyección intraperitoneal o subcutánea de oligonucleótido a diversas dosis, con una dosis máxima 2 mg/kg, o PBS. El número de tratamientos depende de la tasa de crecimiento tumoral en el grupo de control. El experimento se terminó cuando los tumores de cualquier grupo alcanzaron los tamaños máximos permitidos o hasta que se produjo la muerte en cualquier grupo. El efecto del tratamiento se midió como tiempo hasta el deterioro neurológico crónico. Los ratones tratados con oligonucleótido se sacrificaron 24 horas después de la última inyección de oligonucleótido.

15 **Ejemplo 12**

Análisis *in vivo*: inhibición del nivel de proteína HIF-1 α en células tumorales humanas cultivadas *in vivo* por tratamiento sistémico con oligonucleótidos antisentido

20 | Los tumores se homogeneizaron en tampón de lisis (Tris-Cl 20 mM [pH 7,5]; Triton X-100 al 2 %; 1/100 v/v de Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem); 1/100 v/v de Protease Inhibitor Cocktail Set II (Calbiochem)) a 4 °C con el uso de un homogeneizador de tejidos accionado por motor. Se aplicaron 500 μ l de tampón de lisis por cada 100 mg de tejido tumoral. Los lisados tumorales se centrifugaron a 13.000 g durante 5 min a 4 °C para eliminar los desechos tisulares. Las concentraciones de proteínas de los extractos tumorales se determinaron usando el kit de reactivos de ensayo BCA Protein (Pierce, Rockford). El análisis por Western blot de la expresión de proteínas diana se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8.

25
30 La presente invención se ha descrito con especificidad de acuerdo con algunos de sus modos de realización preferentes. Por lo tanto, los siguientes ejemplos solo sirven para ilustrar la invención y no pretenden limitar la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de HIF-1 α en al menos un 20 % a un nivel de oligonucleótido de 100 nM, en el que la secuencia oligonucleotídica es TGGCAAGCATCCTGTA (SEQ ID NO. 55).
2. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto comprende al menos una unidad de análogo de ácido nucleico, tal como al menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (ANB).
3. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la unidad de ANB es oxi-ANB, tio-ANB, amino-ANB, en las configuraciones D- β o L- α o combinaciones de las mismas o ena-ANB.
4. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que al menos cuatro nucleótidos son unidades de ANB.
5. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosforotioato.
6. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el oligonucleótido comprende un segmento de nucleósidos que tienen la capacidad de incorporar ARNasaH.
7. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto es un oligonucleótido antisentido que es un gápmero.
8. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 7, que consiste en o comprende un tramo central de ADN de 4-12 nucleótidos o monómeros modificados reconocibles y escindibles por la ARNasaH (el hueco) flanqueado por de 1 a 6 residuos de beta-D-oxi ANB.
9. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la secuencia oligonucleotídica TGGCAAGCATCCTGTA es un gápmero que comprende un tramo central de ADN de 4-12 nucleótidos que tiene la capacidad de incorporar ARNasaH (el hueco) flanqueado por de 1 a 6 residuos de beta-D-oxi ANB, en el que los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosforotioato.
10. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 9, que está representado por la siguiente fórmula: T_sG_sG_sC_sa_sa_sg_sC_sa_st_sC_sT_sG_sT_sA, en la que los enlaces internucleosídicos (s) son enlaces de fosforotioato.
11. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente un vehículo, diluyente o sal farmacéuticamente aceptables.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el oligonucleótido está enlazado a un conjugado.
13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el oligonucleótido está en forma de un profármaco.
14. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para su uso como un medicamento.
15. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 para su uso en el tratamiento del cáncer o sospecha de cáncer, tal como seleccionado entre cáncer primario y metastásico de mama, colorrectal, de próstata, de páncreas, otros cánceres GI, tumores en el pulmón, cervicouterinos, ováricos, cerebrales, en cabeza y cuello, en el cuello uterino, el colon, el hígado, la tiroides, el riñón, los testículos, el estómago, el intestino, el esófago, la médula espinal, los senos nasales, la vejiga o las vías urinarias.
16. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre preeclampsia, enfermedad intestinal inflamatoria y enfermedad de Alzheimer.
17. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 para su uso en tratamiento, en el que el tratamiento modula la angiogénesis, proliferación de glóbulos rojos, proliferación celular, metabolismo del hierro, metabolismo energético y de la glucosa, regulación del pH, invasión de tejidos, apoptosis, resistencia a múltiples fármacos, respuesta al estrés celular o metabolismo de la matriz.
18. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con las reivindicaciones 14 a 17 para su uso en tratamiento, en el que el tratamiento se combina con la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales.

19. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con las reivindicaciones 14 a 17 para su uso en tratamiento, en el que el tratamiento se combina con la administración de uno o más fármacos seleccionados entre fármacos antiinflamatorios, fármacos antiinflamatorios no esteroides, corticoesteroides, fármacos antivíricos y fármacos inmunomoduladores.
- 5
20. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con las reivindicaciones 14 a 19 para su uso en tratamiento, en el que el tratamiento inhibe la proliferación de células cancerosas.
- 10
21. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con las reivindicaciones 14 a 20 para su uso en tratamiento, en el que el tratamiento incluye una dosis de oligonucleótido desde 0,01 µg a 11 g por kg de peso corporal.

Figura 1/10

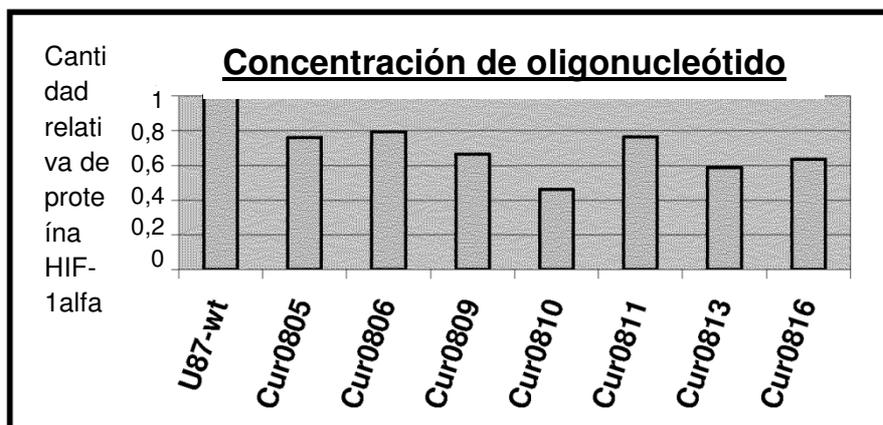
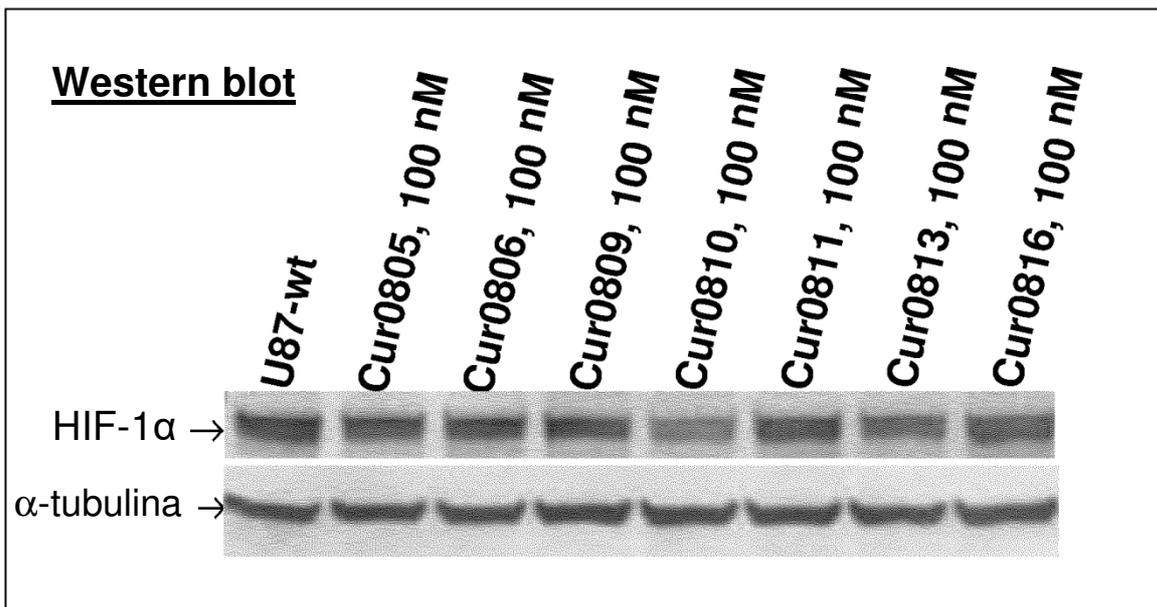


Figura 2/10

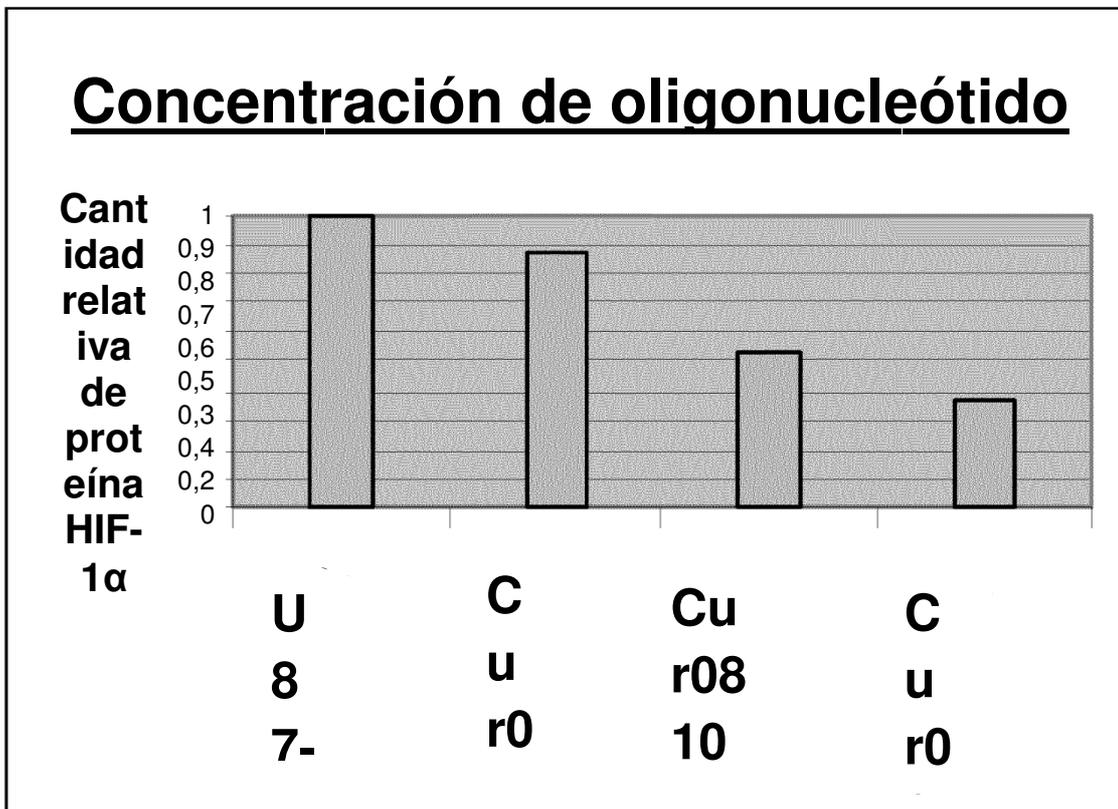
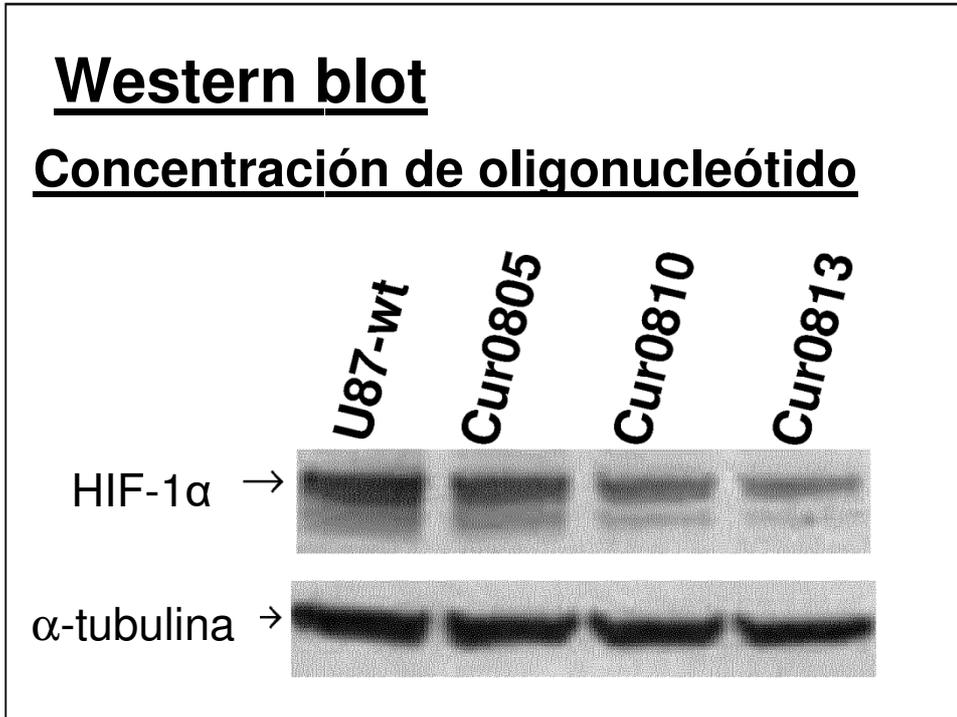


Figura 3/10

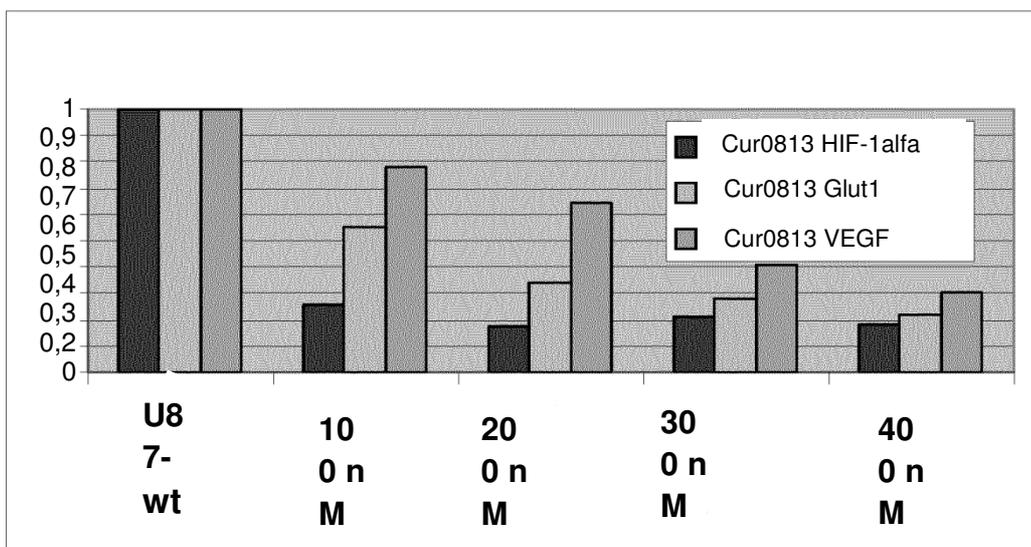
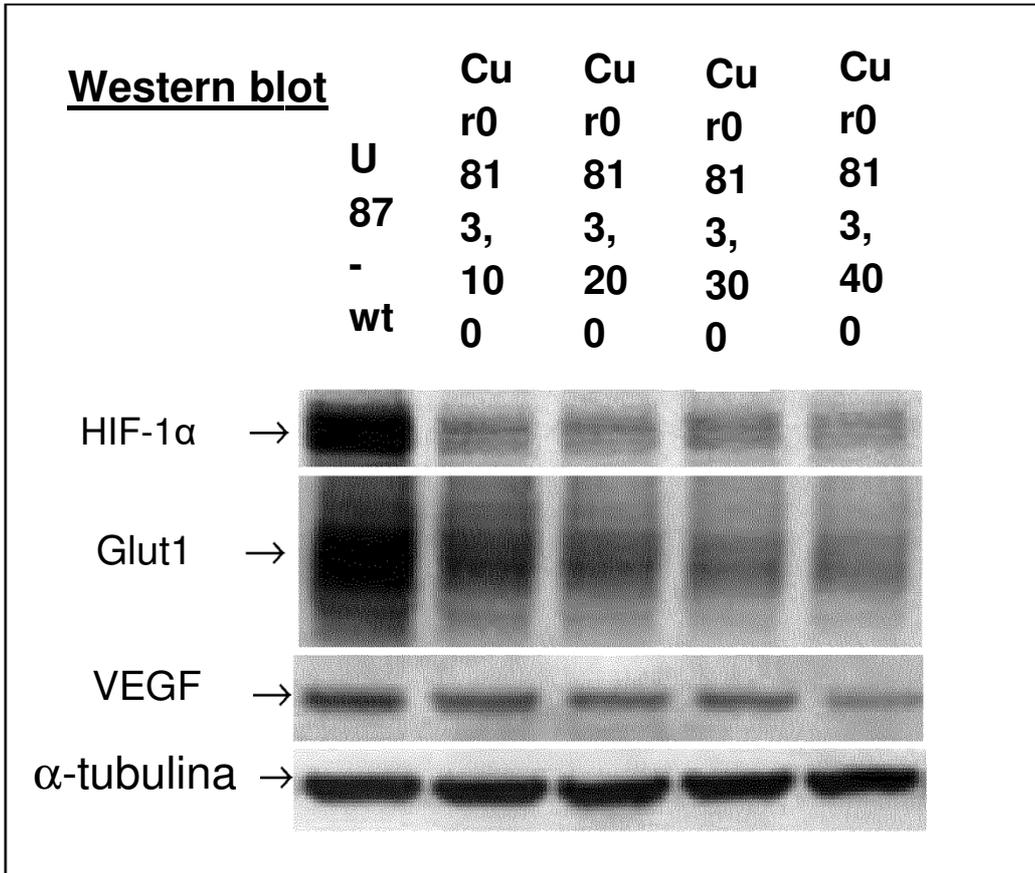


Figura 4/10

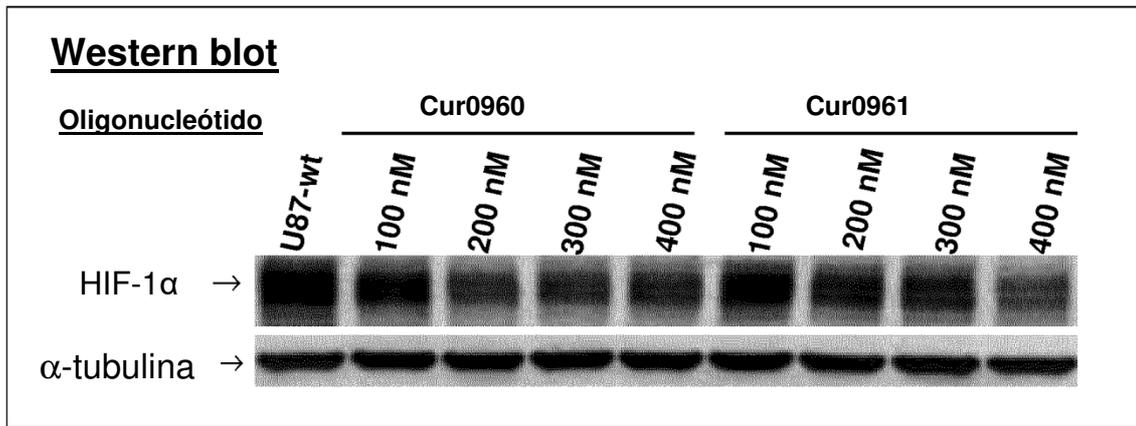


Figura 5/10

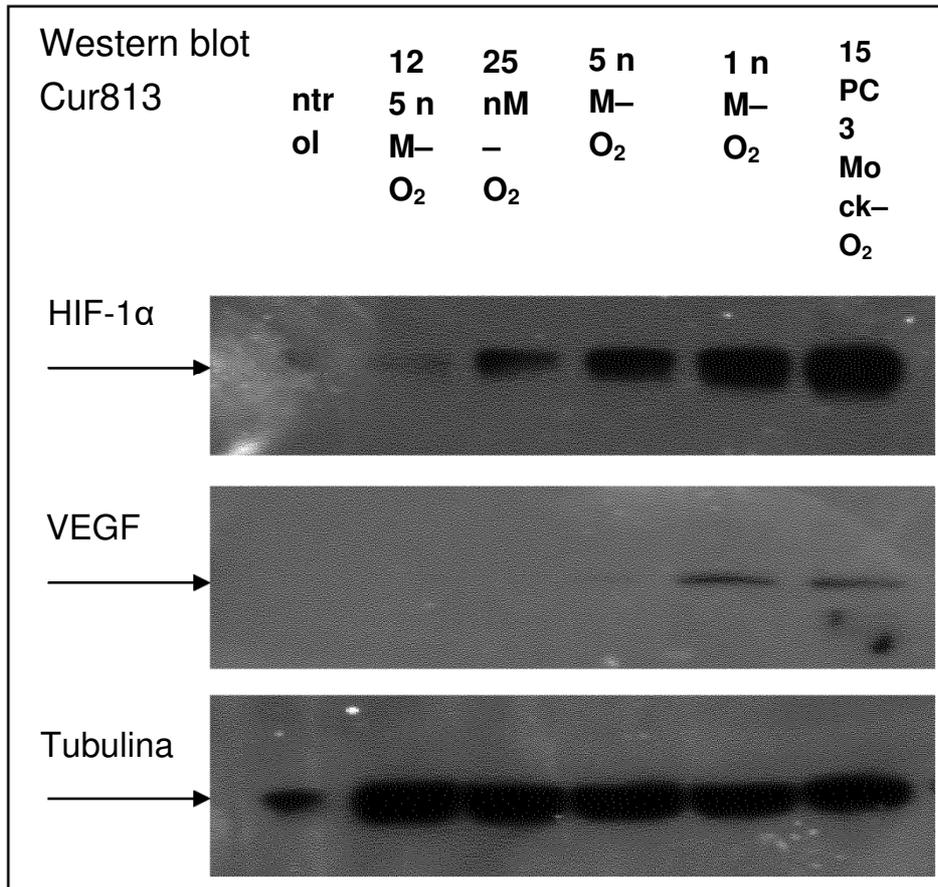


Figura 6/10

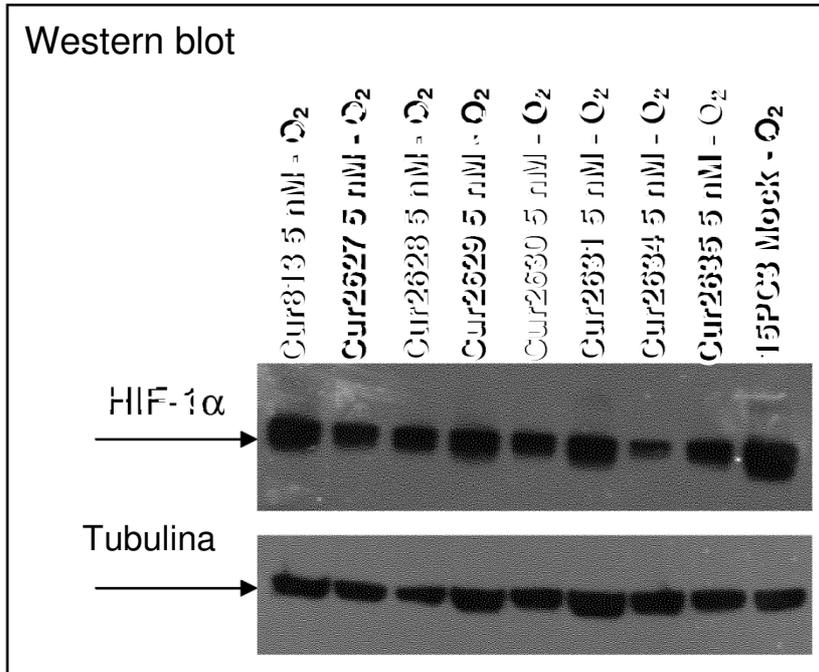


Figura 7/10

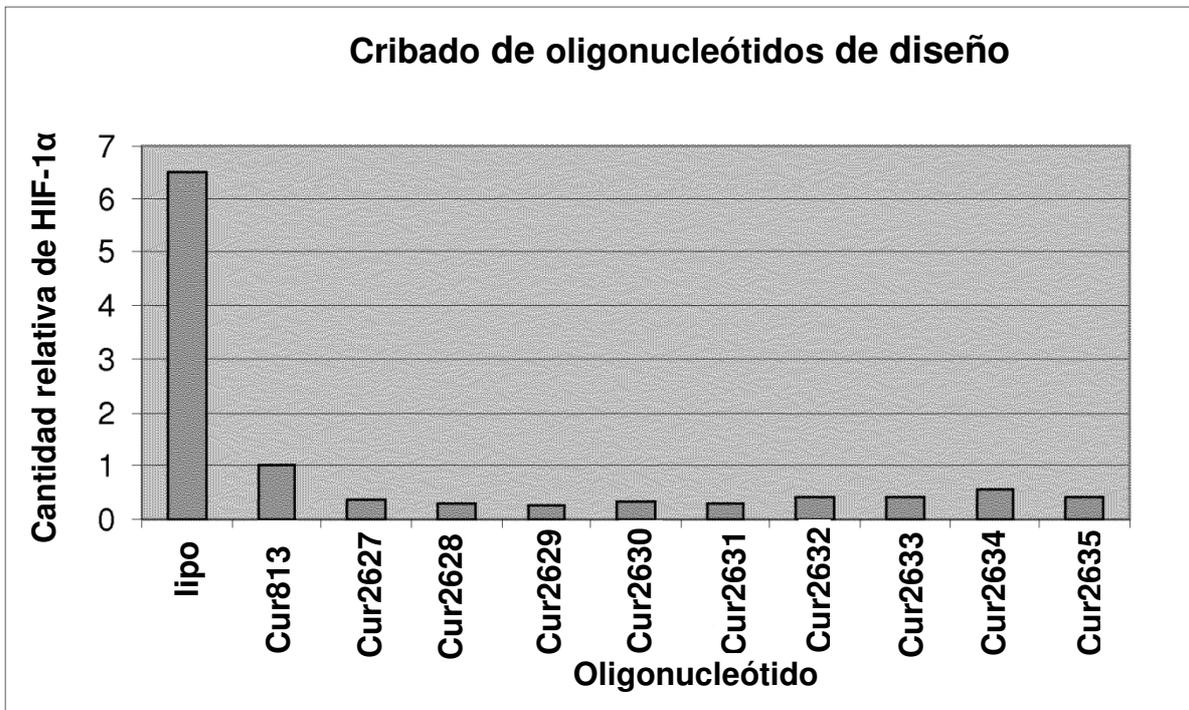
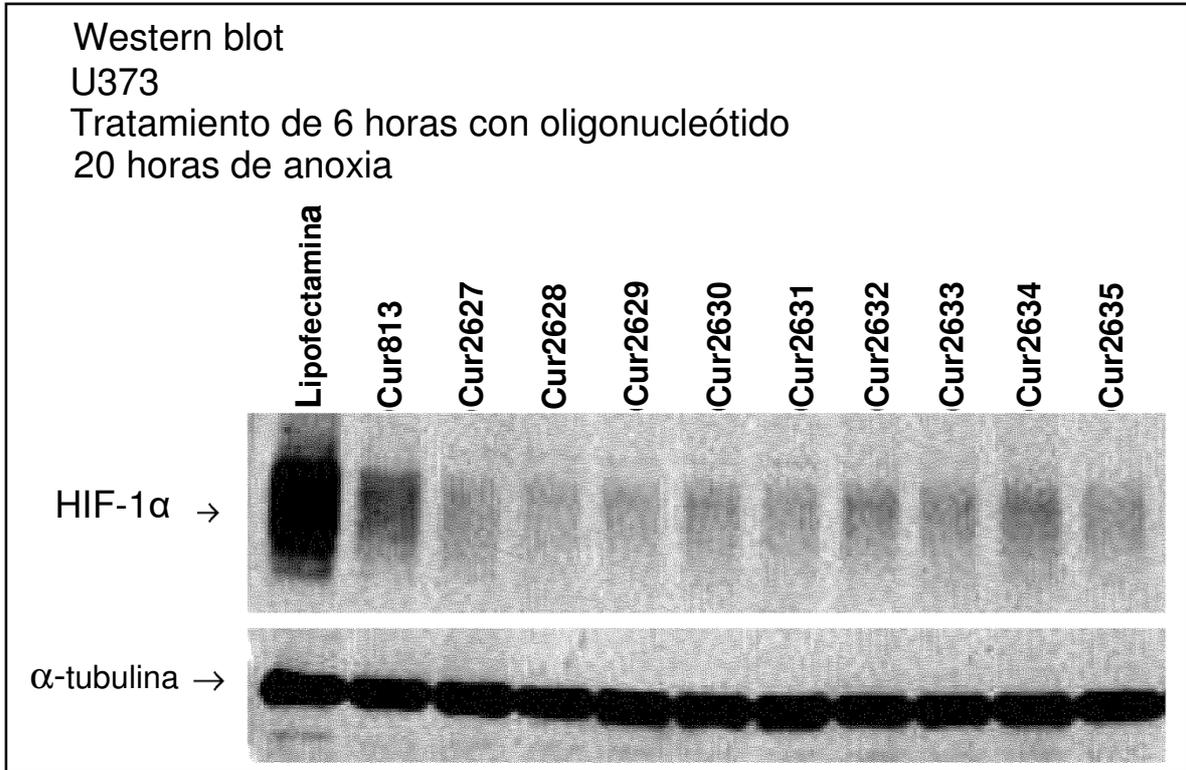


Figura 8/10

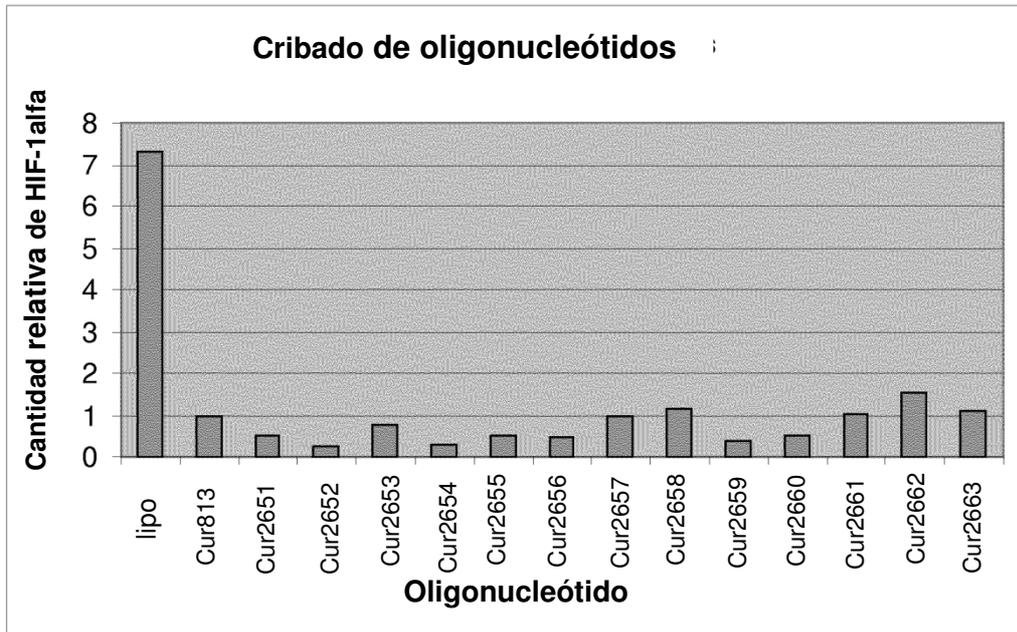
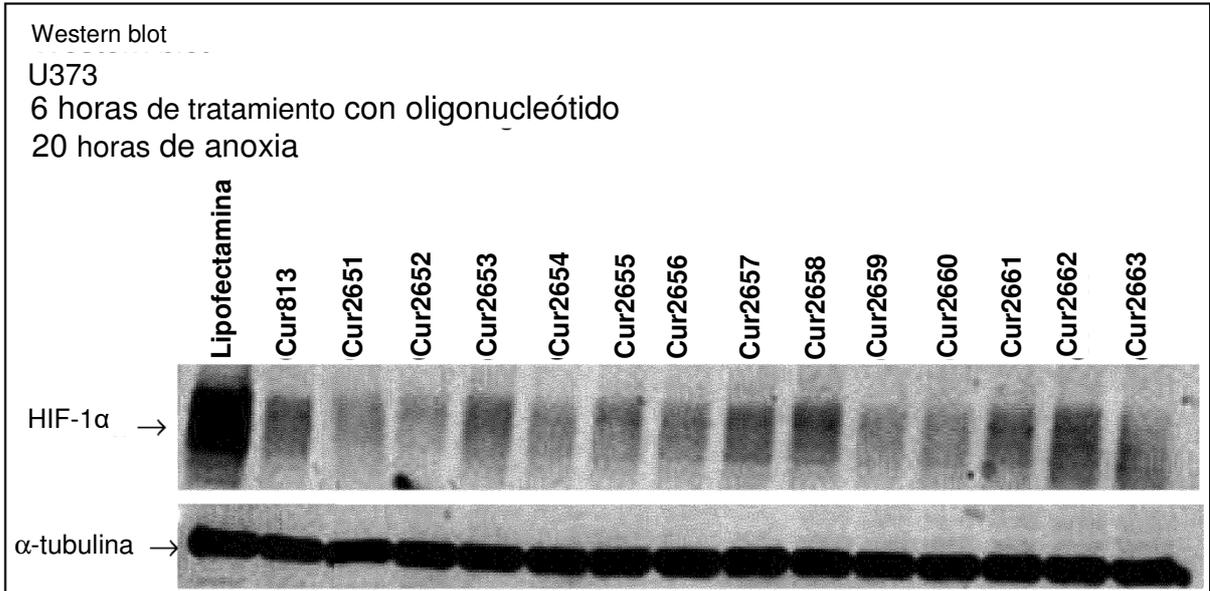
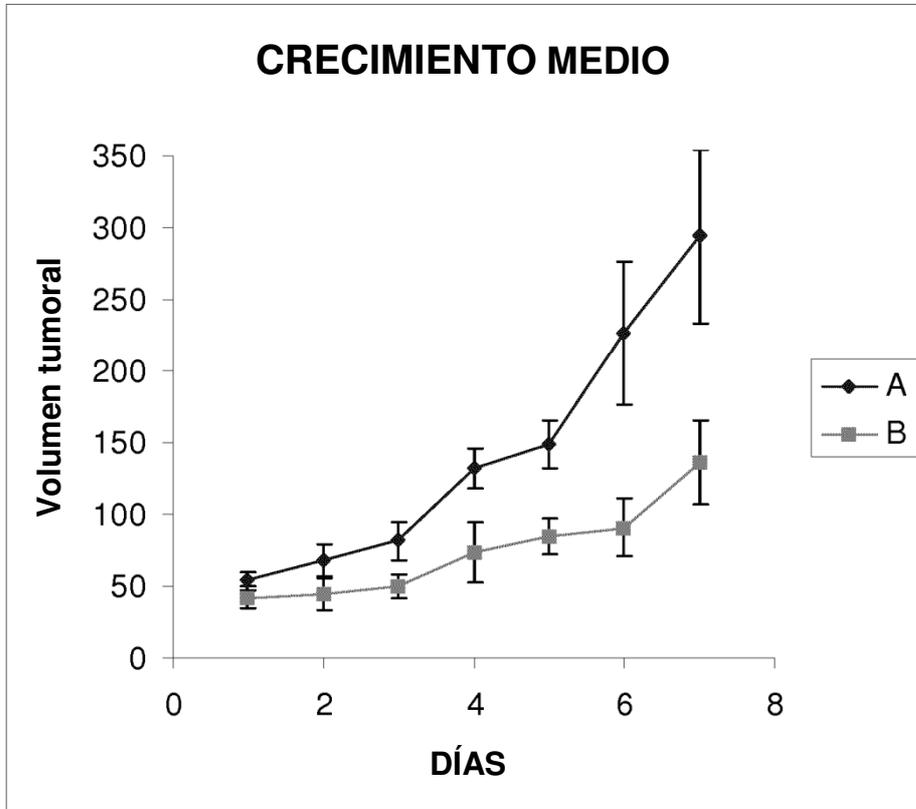


Figura 9/10



B: Cur813 5 mg/kg/día, i.p. x 1 diariamente durante 7 días

5 A: PBS, 100 µl/10 g/día, i.p. x 1 diariamente durante 7 días

Figura 10/10

SEQ ID NO. 1

1 cacgaggcag cactctcttc gtcgcttcgg ccagtgtgtc gggctgggccc ctgacaagcc
 61 acctgaggag aggctcggag ccgggcccgg accccggcga ttgcccggccg cttctctcta
 121 gtctcacgag gggtttcccg cctcgcaccc ccacctctgg acttgccttt ccttctcttc
 181 tccgcgtgtg gagggagcca gcgcttaggc cggagcggagc ctggggggccg cccgcccgtga
 241 agacatcgcg gggaccgatt caccatggag ggcgcggcg gcgcgaacga caagaaaaag
 301 ataagttctg aacgtcgaaa agaaaagtct cgagatgcag ccagatctcg gcgaagtaaa
 361 gaatctgaag tttttatga gcttgcctcat cagttgccac ttccacataa tgtgagttcg
 421 catcttgata aggctctgtg gatgaggctt accatcagct atttgcgtgt gaggaacctt
 481 ctggatgctg gtgatttga tattgaagat gacatgaaag cacagatgaa ttgcttttat
 541 ttgaaagcct tggatggttt tggtatggtt ctcacagatg atggtgacat gatttacatt
 601 totgataatg tgaacaaata catgggatta actcagtttg aactaactgg acacagtgtg
 661 tttgatttta ctcattccatg tgacctgag gaaatgagag aaatgcttac acacagaaat
 721 ggccttgtga aaaagggtaa agaacaaaac acacagcga gctttttct cagaatgaag
 781 tgtaccctaa ctagccgagg aagaactatg aacataaagt ctgcaacatg gaaggtattg
 841 cactgcacag gccacattca cgtatatgat accaacagta accaacctca gtgtgggtat
 901 aagaaaccac ctatgacctg cttggtgctg atttgtgaac ccattcctca cccatcaaat
 961 attgaaattc ctttagatag caagactttc ctcagtcgac acagcctgga tatgaaattt
 1021 tcttattgtg atgaaagaat taccgaattg atgggatatg agccagaaga acttttaggc
 1081 cgctcaattt atgaatatta tcatgctttg gactctgac atctgaccaa aactcatcat
 1141 gatatgttta ctaaaggaca agtcaccaca ggacagtaca ggatgcttgc caaaagaggt
 1201 ggatatgtct gggttgaaac tcaagcaact gtcatatata acaccaagaa ttotcaacca
 1261 cagtgcaattg tatgtgtgaa ttacgttgtg agtggatta ttcagcacga cttgattttc
 1321 tcccttcaac aaacagaatg tgcctttaa cgggttgaat cttcagatat gaaaatgact
 1381 cagctattca ccaaagtga atcagaagat acaagttagc tctttgacaa acttaagaag
 1441 gaacctgatg ctttaacttt gctggcccga gccgctggag acacaatcat atctttagat
 1501 tttggcagca acgacacaga aactgatgac cagcaacttg aggaagtacc attatataat
 1561 gatgtaatgc tcccctcacc caacgaaaaa ttacagaata taaatttggc aatgtctcca
 1621 ttaccaccgg ctgaaacgcc aaagccactt cgaagttagt ctgaccctgc actcaatcaa
 1681 gaagttgcat taaaattaga accaaatcca gactcactgg aactttcttt taccatgccc
 1741 cagattcagg atcagacacc tagtccttcc gatggaagca ctagacaaag ttcacctgag
 1801 cctaatagtc ccagtgaata ttgtttttat gtggatagt atattggtcaa tgaattcaag
 1861 ttggaattgg tagaaaaact ttttgcgtgaa gacacagaag caaagaaccc attttctact
 1921 caggcacacag atttagactt ggagatgta gctccctata tcccaatgga tgatgacttc
 1981 cagttacggt ccttcgatca gttgtcacca ttagaagca gttccgcaag cctgaaagc
 2041 gcaagtctc aaagcacagt tacagtattc cagcagactc aaatacaaga acctactgct
 2101 aatgccacca ctaccactgc caccactgat gaattaaaaa cagtgacaaa agaccgatg
 2161 gaagacatta aaatattgat tgcactcca tctcctacc acatacataa agaaactact
 2221 agtgccacat catcaccata tagagatact caaagtcgga cagcctcacc aaacagagca
 2281 ggaaaaggag tcatagaaca gacagaaaaa tctcatccaa gaagccctaa cgtgttatct
 2341 gtcgctttga gtcaaaagac tacagttcct gaggaagaac taaatccaaa gatactagct
 2401 ttgcagaatg ctcagagaaa gcgaaaaatg gaacatgatg gttcactttt tcaagcagta
 2461 ggaattgtaa cattattaca gcagccagac gatcatgcag ctactacatc actttcttgg
 2521 aaacgtgtaa aaggatgcaa atctagttaa cagaatggaa tggagcaaaa gacaattatt
 2581 ttaataacct ctgatttagc atgtagactg ctggggcaat caatggatga aagtggatta
 2641 ccacagctga ccagttatga ttgtgaagtt aatgctccta tacaaggcag cagaaaccta
 2701 ctgacagggtg aagaattact cagagctttg gatcaagtta actgagcttt ttcttaattt
 2761 cattcctttt tttggacact ggtggctcac tacctaaagc agtctattta tttttctac
 2821 atctaatttt agaagcctgg ctacaatact gcacaaactt ggttagttca atttttgatc
 2881 ccttttctca ttaatttaca ttaatgctct tttttagat gttctttaat gctggatcac
 2941 agacagctca ttttctcag tttttggat ttaaaccatt gcattgcagt agcatcctc
 3001 taaaaaatgc acctttttat ttattttatt ttggctagg agtttatccc ttttctgaat
 3061 tatttttaag aagatgcaaa tataattttt gtaagaaggc agtaaccttt catcatgatc

ES 2 649 817 T3

3121 ataggcagtt gaaaaatfff tacacctfff ttttcacatt ttacataaat aataatgctt
3181 tgccagcagt acgtggtagc cacaattgca caatatatff tcttaaaaaa taccagcagt
3241 tactcatgga atatatctg cgffftataaa actagfffff aagaagaaat ffffffaggc
3301 ctatgaaatt gttaaacctg gaacatgaca ttgttaatca tataataatg attcttaaat
3361 gctgtatggt ttattatffa aatgggtaaa gccatffaca taatatagaa agatatgcat
3421 atatctagaa ggtatgtggc atffatffgg ataaaaatct caatfcagag aaatcatctg
3481 atgtffctat agfcactffg ccagctcaaa agaaaaaat accctatgta gttgtggaag
3541 tffatgctaa tattgtgtaa ctgatattaa acctaaatgt tctgctacc ctgffggtat
3601 aaagatatff tgagcagact gtaaacaaga aaaaaaaaa catgcattct tagcaaaatt
3661 gcctagtatg ttaatffgct caaaatacaa tgtffgatt tatgcactff gfcgctatta
3721 acatcctfff tffcatgtag atffcaataa ttgagtaatt ttagaagcat tattfftagga
3781 atatatagtt gfcacagtaa atatctgff tffctatgt acatfgtaca aatffffcat
3841 fcctfffgct cfffgtgff ggatctaaca ctaactgfat tgtfffgtta catcaataa
3901 acatcctctg tggaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa