

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 147**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/IB2013/051410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13124807**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13716415 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2817407**

54 Título: **Oligonucleótidos para modular la expresión génica y usos de los mismos**

30 Prioridad:

24.02.2012 IT MI20120275

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

24.01.2018

73 Titular/es:

**BIOGENERA S.P.A. (100.0%)
Via Marconi, 46
40046 Porretta Terme (Bologna), IT**

72 Inventor/es:

**TONELLI, ROBERTO;
VENTURELLI, LEONARDO;
TORTORI, ANDREA y
MONTEMURRO, LUCA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 651 147 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

Oligonucleótidos para modular la expresión génica y usos de los mismos

5 La presente invención se refiere a oligonucleótidos para modular la expresión de un gen, en particular para modular un gen responsable de una patología de origen genético, tumoral o viral.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de dichos oligonucleótidos, posible y químicamente modificados, para el tratamiento y/o el diagnóstico de dichas enfermedades. Los oligonucleótidos son secuencias cortas de ácidos nucleicos de ARN o ADN naturales o de ácidos nucleicos sintéticos, por ejemplo PNA (Ácido Nucleico de Péptido), LNA (Ácido Nucleico Bloqueado) y morfolinos.

Los oligonucleótidos han demostrado experimentalmente que son muy efectivos en la modulación de la expresión de un gen en el nivel de la transcripción y la traducción. Debido a esta capacidad, los oligonucleótidos representan un medio válido para el tratamiento de numerosas patologías, en particular enfermedades de origen genético, tumoral o viral.

La modulación de la expresión de un gen puede implicar la inhibición o la activación del mismo.

20 Por ejemplo, se sabe que los oligonucleótidos que son capaces de inhibir la transcripción de un gen al formar un enlace complementario con la hebra antisentido del gen (Hélène C, Bioch Bioph Acta 1990, 1049 (2): 99-125) o modificar el estado de la cromatina en las regiones reguladoras del gen de interés (Rossi JJ, Nat Chem Biol 2007, 3(3): 136-7). Otros oligonucleótidos son capaces de inhibir la traducción génica, por ejemplo, mediante un enlace complementario con el ARN mensajero objetivo (ARNm). En el caso de oligonucleótidos de cadena sencilla, este enlace provoca la degradación enzimática del ARNm por el complejo de RNasa H. En el caso en el que los oligonucleótidos sean moléculas de cadena doble de ARN de "interferencia", el enlace complementario de los oligonucleótidos con el ARNm provoca la degradación del mensajero por la enzima "cortadora" del complejo RISC.

En el último caso, los oligonucleótidos también pueden ser oligonucleótidos equivalentes a un microARN endógeno capaz de asociarse, en virtud de la complementariedad imperfecta, con la región 3'UTR (región no traducida 3') del ARNm objetivo, provocando la traducción de ese ARNm que se va a bloquear.

Los oligonucleótidos también pueden inducir la activación de un gen o un aumento de la transcripción del mismo, por ejemplo mediante un enlace complementario con ARN no codificante antisentido largo (Morris KV, Epigenetics, 2009, 4(5): 296-301), o mediante la inhibición del microARN complementario, con el consiguiente aumento en la traducción del ARNm objetivo del microARN.

Los oligonucleótidos se pueden modificar químicamente con el objetivo de aumentar su efectividad en términos terapéuticos y/o de diagnóstico. Por ejemplo, se puede modificar un oligonucleótido con el fin de mejorar su especificidad y/o fuerza con la que se empareja con la secuencia complementaria, o bien se puede modificar un oligonucleótido con el fin de hacer que sea menos sensible a la degradación enzimática, mejorar su perfil farmacocinético/farmacodinámico, o para facilitar su paso a través de las membranas celulares.

Además de los oligonucleótidos de ácidos nucleicos naturales (es decir, secuencias cortas de ADN y/o ARN), existen oligonucleótidos de ácidos nucleicos sintéticos, por ejemplo, ácidos nucleicos de péptidos (PNA) y ácidos nucleicos bloqueados (LNA), que han sido en gran medida estudiados y caracterizados, sobre todo con el objetivo de modular la expresión de un gen por medio de una estrategia de un antígeno (es decir, diseñado para golpear el gen directamente). Los oligonucleótidos de PNA y LNA, como todos los oligonucleótidos modificados, son en general mucho más estables químicamente que los oligonucleótidos ADN o ARN. Su estabilidad se puede mejorar aún más mediante la síntesis de oligonucleótidos quimera. Un oligonucleótido quimera es, por ejemplo, una secuencia de oligonucleótidos en la que se insertan ambos monómeros clásicos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos) y nucleobases sintéticas (monómeros), por ejemplo monómeros de LNA.

Los LNA se utilizan con una estrategia antisentido para silenciar genes al inhibir la transcripción del gen objetivo (Braasch DA, Nucl Acids Res, 2002, 30(23): 5160-7). Alternativamente, los oligonucleótidos de LNA también se pueden utilizar en una estrategia de antígeno, como se hizo por Smith y colegas (Ge R, Faseb J, 2007, 19(2)-14), quienes diseñaron la secuencia de oligonucleótidos de tal manera que se permite la interacción en ambas hebras del ácido nucleico por medio de un mecanismo de "invasión de hebra", con el fin de formar una estructura "en forma de Z" (definido como oligonucleótidos "Zorro"). Los oligonucleótidos de PNA son enzimáticamente más estables en comparación con otras estructuras de oligonucleósidos. Los PNA se puede unir a ADN de hebra doble (ADNds) a través de "invasión de hebra", o se puede emparejar, de manera complementaria, con una molécula de ADN de hebra sencilla (ADNss), o bien se puede unir a cadenas de ARN, dando lugar a una estructura de PNA/ADN o ARN/PNA de doble hélice híbrida que es termodinámicamente muy estable en comparación con las estructuras "homodúplex" (tales como una hebra doble de ADN/ADN).

65

Los PNA representan un sistema muy ventajoso para modular la expresión de un gen, sobre todo utilizando una estrategia antigénica. De hecho, se ha demostrado que los PNA presentan una alta especificidad para las secuencias objetivo y por lo tanto permiten que la expresión de la proteína sea inhibida de una manera eficiente.

5 Por lo tanto, los PNA representan un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento de enfermedades genéticas o virales.

La única desventaja de PNA es el hecho de que tienen una capacidad limitada para pasar a través de las membranas celulares. Sin embargo, esta limitación se ha resuelto en general mediante la conjugación de oligonucleótidos, y los PNA, en particular, con moléculas capaces de hacer que el paso a través de las membranas celulares sea más efectivo (portadores).

De hecho, los oligonucleótidos, y PNAs específicamente, en general se pueden administrar utilizando portadores (o "etiquetas") conjugados con ellos, por ejemplo secuencias de péptidos con una longitud que varía de 1 a 30 aminoácidos.

Una aplicación particular de los oligonucleótidos se relaciona con modular la expresión de los genes que son activados o reprimidos en los tumores.

20 Se sabe bien que los tumores son provocados por la desregulación de diversos genes. Por lo general, el daño afecta a los proto-oncogenes (o también simplemente oncogenes) como los genes MYC (tra cui MYC, MYCN, MYC1), survivina (BIRC5), BCL2, PLK4, ALK y PKM2, que se activan o sobreexpresan en el tumor. Más aún, en un tumor, los genes antitumorales o oncosupresores tales como la caspasa-8 y RASSF1 por lo general también se inactivan.

25 En particular, los oncogenes de la familia MYC están involucrados en el desarrollo de numerosos tumores humanos y se encuentran entre los genes más responsables de la aparición y progresión de los tumores. La amplificación y/o sobreexpresión de estos genes se asocia casi siempre con tumores, tanto del tipo pediátrico (por ejemplo, neuroblastoma, meduloblastoma y rabdomyosarcoma) como del tipo adulto (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, o glioblastoma) (Pession A, Cur Cancer Drug Target, 2005, 5(4): 273-83). De hecho, actúan a través de mecanismos que son fundamentales para el crecimiento tumoral, tales como inducción de la proliferación celular, resistencia a la apoptosis, formación de metástasis y resistencia a los medicamentos de quimioterapia.

Muchos oligonucleótidos con un efecto antitumoral se conocen en la literatura.

35 Por ejemplo, existen los oligonucleótidos que se dirigen contra los genes MYC, MYCN, BCL2, BIRC5 en las estrategias antisentido (EV Prochownik, Exp Rev Antic Ther 2004, 4(2): 289-302; Felsner DW, Drug News Persp, 2003, 16(6): 370-4; CF Bennet, Exp Opin Investig Drugs, 1999, 8(3): 237-53) o los oligonucleótidos dirigidos contra MYCN y MYC con un efecto antigénico (LC Boffa, Oligonucleotides 2005, 15(2):85-93).

40 También se han generado oligonucleótidos antisentido de fosforotioato basados en ADN con el objetivo de inhibir la traducción del gen MYCN en células de neuroblastoma (Burkhart CA, JNCI, 2003, 95(18): 1394-403) y se han generado oligonucleótidos antisentido a través de "ARN de interferencia pequeña (ARNsi)" para inhibir la traducción del gen MYCN en células de neuroblastoma (Kang JH, Bioch Bioph Res Com, 2006, 351(1): 192-197). Los documentos WO 03/070917 WO 02/092617, WO 2009/009739 y WO 01/61030 divulgan compuestos antisentido y/o de ARNsi dirigidos al gen c-myc. El documento WO 2004/096826 divulga la inhibición de la expresión de N-MYC mediante oligonucleótidos anti-genes de PNA. Sin embargo, aún subsiste una fuerte necesidad para identificar más oligonucleótidos capaces de modular la expresión de un gen de una manera cada vez más específica y selectiva con el fin de ser capaz de tener un efecto terapéutico y/o antitumoral potente.

50 Con el fin de obtener oligonucleótidos utilizables como medios terapéuticos y/o de diagnóstico, es necesario identificar las secuencias de un gen objetivo, o un ARN mensajero objetivo y/o sus secuencias reguladoras respectivas que son capaces de determinar un efecto de modulación significativo y selectivo sobre la expresión del gen en sí mismo en términos de transcripción y traducción.

55 Por lo tanto también subsiste una necesidad sentida para definir las reglas generales que rigen el proceso de identificación - dentro de la secuencia de un gen, o la secuencia de un ARN mensajero o las secuencias reguladoras de los mismos - las secuencias de oligonucleótidos que son más prometedoras para efectos de la modulación de la transcripción/traducción del gen en sí mismo.

60 Las necesidades en este sector como se acaba de describir se cumplen mediante la presente invención, que se refiere a un oligonucleótido antigénico de hebra sencilla complementario a la hebra de ADN antisentido de un gen objetivo, que comprende 6-30 nucleótidos, preferiblemente 12-24 nucleótidos, dicho oligonucleótido se caracteriza por una secuencia que comprende por lo menos tres grupos de por lo menos dos guaninas consecutivas.

65 Preferiblemente los grupos de por lo menos dos guaninas consecutivas son continuos entre sí o separados mediante por lo menos un nucleótido, dicho nucleótido no es una guanina, más preferiblemente los grupos de por lo menos

dos guaninas consecutivas son por lo menos cuatro, cinco o seis en número. De acuerdo con una realización preferida dicho oligonucleótido se conjuga con una secuencia portadora en el extremo 3' y/o 5' de dicho oligonucleótido, preferiblemente un portador seleccionado del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 47-56. De acuerdo con una realización preferida dicho oligonucleótido es por lo menos una molécula de ácido nucleico natural, preferiblemente ADN o ARN, ácido nucleico sintético o posible y químicamente modificado, preferiblemente PNA, LNA o morfolino, posible y químicamente modificado, o una combinación de dicho ácido nucleico natural y dicho ácido nucleico sintético. Preferiblemente 1) dicha por lo menos una molécula de ADN comprende por lo menos un nucleótido LNA, metilfosfonato- LNA, BNA, RNG, DNG, GNA, UNA, ENA, ANA, F-ANA, PNA, G-PNA o morfolino ; o comprende un nucleótido de ARN de 2'O-Metilo, 2'O-Metoxietil o 2'-fluro; o 2) dicha por lo menos una molécula de ARN comprende por lo menos un nucleótido de ARN seleccionado de entre: un nucleótido de 2'O-Metilo, un nucleótido de 2'O-Metoxietilo, un nucleótido de 2'-fluro; o por lo menos un nucleótido de un ácido nucleico seleccionado de entre: LNA, Metilfosfonato LNA, BNA, RNG, DNG, GNA, UNA, ENA, ANA, F-ANA, PNA, G-PNA o morfolino. Más preferiblemente dicha por lo menos una molécula de ADN o dicha por lo menos una molécula de ARN comprende por lo menos un nucleótido modificado al nivel del enlace fosfodiéster como un enlace fosforotioato.

De acuerdo con una realización preferida dicho PNA tiene una estructura estructural modificada en la que el carbono alfa tiene la cadena lateral de arginina o lisina como un sustituyente. De acuerdo con una realización preferida el oligonucleótido se dirige contra por lo menos un gen responsable de una enfermedad de origen genético o viral o contra por lo menos un gen tumoral, en el que dicho gen se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de: por lo menos un gen que pertenece a la familia MYC, preferiblemente MYC, MYCN o MYCL1, BIRC5, BCL2, PLK4, ALK, PKM2, CASP8 y RASSF1. De acuerdo con una realización preferida el oligonucleótido se selecciona de la SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 68 y 69 dirigido contra el gen MYCN. En otra realización preferida, el oligonucleótido se selecciona de la SEQ ID NO:

70-74 dirigida contra el gen MYC; SEQ ID NO: 75, 76 dirigida contra el gen BIRC5; SEQ ID NO: 77-79 dirigida contra el gen ALK; SEQ ID NO: 80-82 dirigida contra el gen BCL2; o SEQ ID NO: 83, 84 dirigida contra el gen PLK4. Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición que comprende por lo menos un oligonucleótido mencionado anteriormente y por lo menos un excipiente farmacológicamente aceptable.

Preferiblemente la composición comprende por lo menos un oligonucleótido mencionado anteriormente, en combinación con un compuesto seleccionado con acción farmacológica, preferiblemente en el grupo que consiste de: NGF, somatostatina, ácido retinoico, actinomicina D, asparaginasa, bleomicina, bussulfan capecitabina, carboplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, cisplatino, citarabina, clorambucilo, dacarbazina, daunorrubicina, docetaxel, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de epirubicina, etopósido, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, clorhidrato de idarrubicina, hidroxiaurea, ifosfosfamida, clorhidrato de irinotecan, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, procarbazona, raltitrexed, streptozocin, tegafur-uracilo, temozolomida, tioguanina, tiotepa, topotecan, vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina y vinorelbina; en la que dicha combinación es preferiblemente: SEQ ID: NO 5 y carboplatino, o etopósido o cisplatino o vincristina.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al oligonucleótido o a la composición divulgada anteriormente para uso como un medicamento.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al oligonucleótido o a la composición divulgada anteriormente para el tratamiento de un tumor en el que dicho tumor es un tumor de adulto o pediátrico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en: neuroblastoma, retinoblastoma, meduloblastoma, ependimoma, feocromocitoma, carcinoma embrionario, tumor de células germinales, rhabdomyosarcoma alveolar, rhabdomyosarcoma embrionario, tumor de Wilms, sarcoma de células claras del riñón, sarcoma sinovial, hepatoblastoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, linfoma de Burkitt, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielocítica crónica, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfocítica crónica B, leucemia de células T, linfomas, cáncer de pulmón de células pequeñas (microcitoma), adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células epidermoides, cáncer de pulmón primario típico y atípico, carcinoma de pulmón de células grandes, carcinoma de pulmón neuroendocrino de células grandes, glioblastoma, hepatocarcinoma, carcinoma de células basales, tumor de ovario, tumor de mama y cáncer de colon.

En el caso de ácidos nucleicos naturales (ADN y ARN), cada monómero (nucleótido) consiste de una base nitrogenada, un azúcar y un trifosfato. La base se selecciona de entre adenina, guanina, timina, citosina y uracilo (solo en ARN). El azúcar es desoxirribosa en el caso de ADN y ribosa en el caso de ARN. Los monómeros se unen en el polímero mediante un enlace fosfodiéster.

En realizaciones adicionales por lo menos tres grupos de guaninas preferiblemente comprenden por lo menos cuatro, cinco o seis grupos de por lo menos dos guaninas consecutivas.

Alternativamente los por lo menos tres grupos de guaninas preferiblemente comprenden por lo menos un grupo de por lo menos dos guaninas consecutivas y por lo menos dos grupos de por lo menos tres guaninas consecutivas.

Alternativamente los por lo menos tres grupos de guaninas preferiblemente comprenden por lo menos un grupo de por lo menos tres guaninas consecutivas y por lo menos dos grupos de por lo menos dos guaninas consecutivas.

5 Alternativamente los por lo menos tres grupos de guaninas preferiblemente comprenden por lo menos un grupo de por lo menos dos guaninas consecutivas, por lo menos un grupo de por lo menos tres guaninas consecutivas y/o por lo menos un grupo de seis guaninas consecutivas.

10 En general, los oligonucleótidos de la presente invención son perfectamente complementarios a la secuencia objetivo y, preferiblemente, los grupos de guaninas consecutivas pueden ser consecutivos entre sí de tal manera que, por ejemplo, tres grupos de 2 guaninas consecutivas es un grupo de 6 guaninas consecutivas.

Alternativamente, los grupos de guaninas consecutivas se pueden separar mediante por lo menos un nucleótido.

15 En general, los por lo menos tres grupos de por lo menos dos guaninas consecutivas de acuerdo con la presente invención se pueden ubicar cerca del extremo 5' del oligonucleótido, o cerca del extremo 3' del oligonucleótido, o también se pueden localizar en el centro de la secuencia de oligonucleótidos.

20 En realizaciones preferidas de la presente invención se conjuga dicho oligonucleótido, preferiblemente en su extremo 3' y/o 5', con una secuencia portadora, que es preferiblemente una secuencia de aminoácidos corta.

Dicha secuencia de aminoácidos corta (portadora) preferiblemente consiste de un número de aminoácidos que varía desde 1 a 30, preferiblemente 1 a 10, incluso más preferiblemente 1 a 7. Los aminoácidos pueden estar en la forma L o D, preferiblemente en la forma D.

25 Los portadores que se prefieren para los propósitos de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 47 (PKKKRKV); SEQ ID NO: 48 (VKRKKKP); SEQ ID NO: 49 (KKKKKK); SEQ ID NO: 50 (PKRKRKV); SEQ ID NO: 51 (KRKRKRK); SEQ ID NO: 52 (KKKRKV); SEQ ID NO: 53 (PKKKRK); SEQ ID NO: 54 (KKKRK); SEQ ID NO: 55 (RRRR) y SEQ ID NO: 56 (PKKKRKVVHHHH).

30 El portador que particularmente se prefiere para los propósitos de la presente invención es el péptido que tiene la SEQ ID NO: 47.

35 En el contexto de la presente invención, "portado" significa un péptido capaz de modificar forma Da favorable el perfil farmacodinámico y/o farmacodinámico y/o penetración celular y/o nuclear de un oligonucleótido.

En el contexto de la presente invención, "modular la expresión de un gen" significa inhibir o activar (aumentar) la expresión de un gen. Dicha inhibición o activación de (aumento en) la expresión génica puede ocurrir sobre un nivel de transcripción o traducción.

40 La inhibición o activación de la expresión génica se puede lograr en un nivel de transcripción por medio de oligonucleótidos que actúan con un mecanismo de antígeno (o oligonucleótido antígeno, es decir, dirigidos contra la hebra antisentido del gen, es decir, la estrategia antigénica). Los parámetros o reglas o requisitos previos que un oligonucleótido debe satisfacer con el fin de modular efectivamente la expresión de un gen, identificado por el Solicitante y que se ha indicado anteriormente, son válidos para cualquier gen en absoluto y por lo tanto se pueden
45 aplicar, por ejemplo, para el propósito de identificar secuencias de oligonucleótidos que son capaces de modular la expresión del gen responsable de enfermedades de origen genético y/o viral o de los genes implicados en la aparición de patologías tumorales.

50 Se pueden utilizar los oligonucleótidos identificados de esta manera, preferiblemente como fármacos, en métodos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades genéticas, virales o tumorales específicas.

Alternativamente, se pueden utilizar los oligonucleótidos para propósitos de diagnóstico.

55 De hecho, la divulgación se refiere al uso de los oligonucleótidos de la invención, posibles y químicamente modificados, para propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico.

60 Los oligonucleótidos de la presente invención son oligonucleótidos cortos de 6-30, preferiblemente 12-24 residuos (nucleótidos o monómeros). Los oligonucleótidos pueden consistir de una base de ácido nucleico natural, por ejemplo ADN o ARN, o una base de ácido nucleico sintético, por ejemplo PNA, LNA o morfolino. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden comprender una combinación de ADN, ARN y/o ácidos nucleicos sintéticos, preferiblemente PNA o LNA (oligonucleótidos híbridos o quiméricos).

65 En algunas realizaciones de la presente invención, los oligonucleótidos se pueden modificar químicamente, por ejemplo para el propósito de mejorar su efectividad terapéutica y/o diagnóstica.

En realizaciones preferidas de la presente invención, los oligonucleótidos pueden ser moléculas de PNA con una estructura principal en la que el carbono en la posición alfa ($C_{\alpha(\alpha)}$) se une a sustituyentes diferentes del átomo de hidrógeno típico de la glicina. Por ejemplo, en lugar de la cadena lateral de la glicina se puede utilizar la cadena lateral de otro aminoácido de origen natural o sintético, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en:

5 arginina, lisina, histidina, leucina, isoleucina, tirosina, asparagina, serina, treonina, glutamina, valina, alanina, cisteína, metionina, fenilalanina, glutamato, aspartato, prolina, triptofano y ornitina. Dicho aminoácido puede tener la configuración dextrorrotatoria (D) o la configuración levorotatoria (L).

En algunos casos, dicho "ARN de interferencia pequeña" comprende monómeros de ARN (ribonucleótidos) y por lo menos un monómero modificado en la posición 2' de la ribosa, preferiblemente un monómero de 2'-O-metoxietilo, 2'-O-metilo o 2'-fluoro; o dicho "ARN de interferencia pequeña" comprende monómeros de ARN (ribonucleótidos) y por lo menos un monómero de un ácido nucleico sintético preferiblemente seleccionado de entre: LNA, Metilfosfonato LNA, BNA (ácido nucleico puenteado), UNA (ácido nucleico no bloqueado), ENA (etileno-ácido nucleico puenteado), ANA (ácido nucleico de arabinosa) y F-ANA (ácido nucleico de fluoro-arabinosida).

En casos preferidos, dicho "ARN de interferencia pequeña" se designa de tal manera que en los extremos de la hebra doble complementaria, solo una de las dos hebras tiene por lo menos uno, preferiblemente dos, monómeros de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que sobresalen, es decir no están emparejados. En realizaciones adicionales, los ácidos nucleicos naturales o sintéticos sobresalientes preferiblemente se seleccionan de entre: un monómero de 2'-O- metoxietilo, 2'-O-metilo y 2'-fluoro o un monómero de: LNA, Metilfosfonato LNA, BNA, UNA (ácido nucleico no bloqueado), ENA (etileno-ácido nucleico puenteado), ANA (ácido nucleico de arabinosa) y F-ANA (ácido nucleico de fluoro-arabinosida).

En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos se definen como híbrido o quimérico y son monómeros de ARN que comprenden cadenas sencillas (ribonucleótidos) y monómeros de LNA (este oligonucleótido se representa como ARN/LNA).

Alternativamente, los oligonucleótidos híbridos pueden comprender los monómeros de ARN (ribonucleótidos) y por lo menos un monómero de ARN seleccionado de entre: un monómero de 2'-O-Metoxietilo (MOE), un monómero de 2'-O-metilo y un monómero de 2'-fluoro; o los oligonucleótidos híbridos pueden comprender monómeros de ARN (ribonucleótidos) y por lo menos un monómero de un ácido nucleico sintético preferiblemente seleccionado de entre: LNA, metilfosfonato LNA, UNA (ácido nucleico no bloqueado), BNA, ENA (ácido nucleico de etilen), ANA (ácido nucleico de arabinosa) y F-ANA (ácido nucleico de fluoro-arabinosida).

En una realización adicional, los oligonucleótidos basados en ARN de cadena sencilla pueden comprender ribonucleótidos clásicos (es decir no modificados químicamente) y ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que se han modificado al nivel del enlace fosfodiéster, por ejemplo por medio de un enlace fosforotioato, o DNG (guanidina desoxirribonucleica), RNG (ribonucleico guanidina), GNA (ácido nucleico de glicerol), G-PNA (gamma-PNA) o PMO (Morfolino).

En realizaciones preferidas de la invención, los oligonucleótidos son secuencias quiméricas que comprenden secuencias de hebra sencilla que comprenden monómeros de ADN (desoxirribonucleótidos) y monómeros de LNA.

Para una estrategia antigénica, que significa modular la expresión de un gen sobre el nivel de transcripción, preferiblemente se puede emplear:

- oligonucleótidos a base de PNA, opcionalmente conjugados con un portador (que generalmente consiste de 1 a 30 residuos), preferiblemente en el extremo 3' y/o 5'; o

- oligonucleótidos a base de PNA, dicho PNA comprende por lo menos un carbono alfa (C-alfa) de la estructura principal con un sustituyente diferente del átomo de H de la glicina canónica; o

- oligonucleótidos de cadena sencilla que comprenden monómeros de ARN (los ribonucleótidos clásicos) y opcionalmente por lo menos un nucleótido modificado (monómero) (por ejemplo un monómero de ARN 2'-O-Metilo, un monómero de ARN 2'-Fluoro), o por lo menos un monómero de un ácido nucleico seleccionado de entre: LNA, metilfosfonato LNA, BNA, UNA, GNA, ANA, FANA, ENA, DNG y RNG, o un ribonucleótido modificado al nivel del enlace fosfodiéster; o

- oligonucleótidos a base de ARN de hebra doble mutuamente complementarios (siARN); o

- oligonucleótidos quiméricos de hebra doble parcialmente complementarios que comprenden monómeros de ARN (los ribonucleótidos clásicos) y por lo menos un monómero de LNA; o

- oligonucleótidos quiméricos de hebra doble que comprenden monómeros de ARN (los ribonucleótidos clásicos) y por lo menos un monómero de ARN 2'-O-(2-Metoxietil); o

• oligonucleótidos quiméricos de hebra sencilla que comprenden monómeros de ADN (los desoxirribonucleótidos clásicos) y por lo menos un monómero de LNA; o

5 • oligonucleótidos que comprenden monómeros de ADN (los desoxirribonucleótidos clásicos) y por lo menos un monómero de ARN 2'-Fluoro o por lo menos un monómero de un ácido nucleico seleccionado de entre: LNA, Metilfosfonato LNA, BNA, UNA, GNA, ENA, ANA, FANA, DNG y RNG.

10 Preferiblemente, los oligonucleótidos de la presente invención se dirigen contra un gen implicado en el desarrollo de una enfermedad de origen genético y/o viral o un tumor. Dicho gen se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de: genes de la familia MYC (preferiblemente MYC, MYCN, MYCL1), genes de survivina (BIRC5), BCL2, PLK4, ALK, PKM2, caspasa- 8 y RASSF1.

15 En particular, los oligonucleótidos de la presente invención se dirigen contra los genes de la familia MYC, preferiblemente contra MYCN. También se divulgan oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 2-15, 66-84, SEQ ID NO: 24, 25, 31 y 32, el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 26 y 57, el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 27 y 58, el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 28 y 59, el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 29 y 60, el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 30 y 61, el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 33 y 62, el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 34 y 63, el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 35 y 64 y el par de oligonucleótidos complementarios que tienen la SEQ ID NO: 36 y 65.

25 En algunas realizaciones, dichos oligonucleótidos son oligonucleótidos de PNA, preferiblemente dichos PNA se dirigen contra MYCN.

En algunos casos los PNA se seleccionan del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 2-15.

En casos adicionales los PNA se seleccionan del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 66-84.

30 En casos adicionales los PNA se seleccionan del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 2-15, 66-84.

35 Preferiblemente, los oligonucleótidos de PNA se seleccionan del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 2-13, más preferiblemente SEQ ID NO: 2-8, incluso más preferiblemente SEQ ID NO: 2-6. El oligonucleótido de PNA que se prefiere particularmente para los propósitos de la presente invención es la SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la SEQ ID NO: 5 se conjuga en el extremo 5' o 3' con la SEQ ID NO: 47. Más preferiblemente, la SEQ ID NO: 47 consiste de aminoácidos en forma D.

40 Los PNA DE LA SEQ ID NO: 2-15 preferiblemente se dirigen contra MYCN y, más preferiblemente, modulan la expresión de MYCN con una estrategia antigénica.

Los PNA DE LA SEQ ID NO: 66-69 preferiblemente también se dirigen contra MYCN y, más preferiblemente, modulan la expresión de MYCN con una estrategia antigénica.

45 Los PNA DE LA SEQ ID NO: 70-74 preferiblemente se dirigen contra MYC y, más preferiblemente, modulan la expresión de MYC con una estrategia antigénica.

Los PNA DE LA SEQ ID NO: 75, 76 preferiblemente se dirigen contra BIRC5 y, más preferiblemente, modulan la expresión de BIRC5 con una estrategia antigénica.

50 Los PNA DE LA SEQ ID NO: 77-79 preferiblemente se dirigen contra ALK y, más preferiblemente, modulan la expresión de ALK con una estrategia antigénica.

55 Los PNA DE LA SEQ ID NO: 80-82 preferiblemente se dirigen contra BCL2 y, más preferiblemente, modulan la expresión de BCL2 con una estrategia antigénica.

Los PNA DE LA SEQ ID NO: 83, 84 preferiblemente se dirigen contra PLK4 y, más preferiblemente, modulan la expresión de PLK4 con una estrategia antigénica.

60 En realizaciones adicionales, dichos oligonucleótidos son oligonucleótidos quiméricos de ADN-LNA, preferiblemente dichos oligonucleótidos se dirigen contra MYCN.

En otros casos los oligonucleótidos quiméricos de ADN-LNA se seleccionan del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 24 y 25.

65 La SEQ ID NO: 24 y 25 se dirigen contra el gen MYCN.

La SEQ ID NO: 24 y 25 modulan la expresión génica a través de una estrategia antigénica.

5 En realizaciones adicionales, dichos oligonucleótidos son oligonucleótidos quiméricos de hebra sencilla que comprenden monómeros de ADN y/o por lo menos un monómero de ADN de fosforotioato. Dichos oligonucleótidos preferiblemente se dirigen contra MYCN.

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere al uso de los oligonucleótidos descritos anteriormente para propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico.

10 En particular, se pueden utilizar los oligonucleótidos individualmente o combinarse entre sí para el tratamiento de enfermedades de origen genético y/o viral, en particular para el tratamiento de enfermedades genéticas provocadas ya sea por la sobreexpresión o la inhibición de un gen, es decir, las enfermedades genéticas que requieren la modulación de la expresión de un gen que se sobreexpresa o se inhibe.

15 Se pueden utilizar los oligonucleótidos divulgados para el tratamiento terapéutico de una enfermedad genética, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste de: síndrome de Gorlin, síndrome de Down, síndrome de Feingold, enfermedad de Hirschsprung, síndrome de Von Hippel Lindau, Ataxia telangiectasia, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Turcot, tumores familiares y enfermedad de Parkinson.

20 Adicionalmente, los oligonucleótidos de la invención se utilizan para el tratamiento terapéutico de patologías tumorales en niños o adultos. En particular, los tumores a los que se hace referencia son provocados, preferiblemente, por la sobreexpresión de un gen u oncogén seleccionado del grupo que consiste en: MYC, MYCN, MYCL1, survivina (BIRC5), BCL2, PLK4, ALK y PKM2. Alternativamente, los tumores son provocados, preferiblemente, por la inhibición (inactivación) de un gen oncosupresor o anti-tumor y preferiblemente seleccionado del grupo que consiste de: caspasa-8 y RASSF1.

30 Los tumores a los que se hace referencia preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste de: neuroblastoma, retinoblastoma, meduloblastoma, ependimoma, feocromocitoma, carcinoma embrionario, tumor de células germinales, rhabdomyosarcoma alveolar, rhabdomyosarcoma embrionario, tumor de Wilms, sarcoma de células claras del riñón, sarcoma sinovial, hepatoblastoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, linfoma de Burkitt, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfocítica crónica B, leucemia de células T, linfomas, cáncer de pulmón de células pequeñas (microcitoma), adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células epidermoides, cáncer de pulmón primario típico y atípico, carcinoma de pulmón de células grandes, carcinoma de pulmón neuroendocrino de células grandes, glioblastoma, hepatocarcinoma, carcinoma de células basales, tumor de ovario, tumor de mama y cáncer de colon.

35 Para los propósitos de la presente invención particularmente se prefieren los tumores seleccionados del grupo que consiste de: neuroblastoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms, meduloblastoma, cáncer de pulmón de células pequeñas y carcinoma de células basales.

40 La materia objeto de la presente invención adicionalmente se refiere a una composición que comprende por lo menos un oligonucleótido de acuerdo con la presente invención y por lo menos un excipiente farmacológicamente aceptado. Preferiblemente, dicho por lo menos un oligonucleótido es un PNA, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 68-84 más preferiblemente la SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6. El oligonucleótido que se prefiere particularmente es la SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la SEQ ID NO: 5 se conjuga en el extremo 5' o 3' con la SEQ ID NO: 47. Más preferiblemente, la SEQ ID NO: 47 consiste de aminoácidos en la forma D.

45 Dicho PNA preferiblemente se conjuga en su extremo 5' o 3' con un portador que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 47-56.

50 La divulgación adicionalmente se refiere a una combinación que comprende por lo menos un oligonucleótido que incluye el oligonucleótido que tiene la SEQ ID NO: 1, por lo menos un compuesto, preferiblemente por lo menos un compuesto con un efecto farmacológico, más preferiblemente un agente quimioterapéutico, y, opcionalmente, por lo menos un excipiente farmacológicamente aceptado.

55 En algunos casos dicho por lo menos un compuesto es por lo menos un oligonucleótido antigénico y/o antisentido adicional, o por lo menos un agente farmacológico, o por lo menos un compuesto de origen biológico o biotecnológico o que se deriva de síntesis química o combinaciones de los mismos. Dicho compuesto de origen biológico o biotecnológico o derivado de síntesis química se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de: un anticuerpo monoclonal, un agente quimioterapéutico, un agente inmunomodulador, un factor de crecimiento, una citoquina, un péptido, un inhibidor de angiogénesis, un inhibidor de crecimiento tumoral, una hormona esteroidea y/o una hormona no esteroidea y vitaminas.

60

Ejemplos de compuestos que se prefieren particularmente para los propósitos de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste de: factor de crecimiento de nervio (NGF), somatostatina, ácido retinoico, actinomicina D, asparaginasa, bleomicina, bussulfan capecitabina, carboplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, cisplatino, citarabina, clorambucilo, dacarbazina, daunorrubicina, docetaxel, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de epirubicina, etopósido, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, clorhidrato de idarrubicina, hidroxurea, ifofosfamida, clorhidrato de irinotecan, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, nutlina, oxaliplatino, paclitaxel, procarbazona, raltitrexed, estreptozocin, tegafur-uracilo, temozolomida, tioguanina, tiotepa, topotecan, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina y combinaciones de los mismos.

Más preferiblemente, los compuestos se seleccionan del grupo que consiste de: carboplatino, cisplatino, etopósido, vincristina, ciclofosfamida y combinaciones de los mismos.

El solicitante ha encontrado que la administración de por lo menos un oligonucleótido de acuerdo con la invención en concomitancia con por lo menos un compuesto, preferiblemente por lo menos un agente quimioterapéutico, como se describió anteriormente, hace posible reducir la concentración de dicho compuesto que se va a administrar, mientras que al mismo tiempo se garantiza un aumento en la efectividad terapéutica y menor toxicidad.

El Solicitante ha encontrado que, bajo estas condiciones, la reducción en la concentración de dicho compuesto depende de la patología particular; en particular, la concentración del compuesto quimioterapéutico depende del tipo de tumor. Para algunos tumores, como: neuroblastoma, retinoblastoma, meduloblastoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, tumor de Wilms, rhabdomyosarcoma alveolar y rhabdomyosarcoma embrionario, la concentración de por lo menos un agente quimioterapéutico, administrado en combinación con por lo menos un oligonucleótido de acuerdo con la presente invención, se puede reducir hasta diez veces mientras que se garantiza el mismo efecto terapéutico como una dosis normal de un agente quimioterapéutico.

Particularmente efectiva como una combinación farmacéutica (en términos de efecto terapéutico mejorado) es la combinación de por lo menos un PNA de acuerdo con la presente divulgación, preferiblemente por lo menos un PNA seleccionado del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 1-15, 66-84, preferiblemente SEQ ID NO: 1-13, más preferiblemente SEQ ID NO: 1-8, más preferiblemente SEQ ID NO: 1-6, incluso más preferiblemente SEQ ID NO: 1 y/o 5, y por lo menos un compuesto, preferiblemente a agente quimioterapéutico, más preferiblemente seleccionado del grupo que consiste de: etopósido (VP16), carboplatino, cisplatino o vincristina, ciclofosfamida y combinaciones de los mismos.

Se divulga particularmente una combinación seleccionada de entre: SEQ ID: NO 1 y carboplatino, o etopósido o cisplatino o vincristina; o SEQ ID: NO 5 y carboplatino o etopósido o cisplatino o vincristina.

Dicho PNA preferiblemente se conjuga en su extremo 3' y/o 5' con un portador, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 47-56.

El efecto de mejora preferiblemente se encuentra cuando se administra la combinación de forma simultánea y cuando dicho por lo menos un compuesto se administra en tiempos sucesivos, preferiblemente a intervalos, más preferiblemente a intervalos regulares de 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas.

En realizaciones preferidas, por lo menos un oligonucleótido de la invención, se puede administrar conjugado o en complejo, preferiblemente con por lo menos una partícula de vehículo, por lo menos un polímero de vehículo o por lo menos un oligonucleótido de vehículo autoensamblado (también conocido como aptámeros).

En realizaciones preferidas adicionales, por lo menos un oligonucleótido de la invención, se puede conjugar o complejar y administrar con por lo menos una mezcla liposómica, por lo menos una micropartícula o por lo menos una nanopartícula tal como para favorecer la penetración del tejido objetivo.

Dicha partícula, usualmente de forma esférica y utilizada como un medio de suministro específico, se puede formular con muchos compuestos químicos diferentes. Por ejemplo, dicha partícula puede ser una formulación o co-formulación de compuestos poliméricos tales como: quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol (PEG), polietilenimina (PEI), ácido poliláctico (PLA), poli (ácido glicólico láctico) (PLGA), hidroxiapatita (HAP), ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos saturados, lípidos catiónicos, HAP-PLA, HAP-PLA/PGA y derivados de los mismos.

En realizaciones adicionales preferidas, por lo menos un oligonucleótido de la invención se puede administrar conjugado o complejo, preferiblemente con por lo menos una partícula del tipo anteriormente descrito, y por lo menos un ligando o por lo menos una parte de un ligando a un receptor específico de la células objetivo (tal como, por ejemplo, GD2, ácido fólico, TRAIL, NGF), ya sea de origen químico o biotecnológico, puede estar presente en las membranas poliméricas como un adyuvante, útil para favorecer la internalización de dicho oligonucleótido de la invención en la células objetivo.

En realizaciones adicionales preferidas, por lo menos un oligonucleótido de la invención se puede conjugar con por lo menos un ligando o una porción de un ligando (tal como, por ejemplo, GD2 (gangliósido GD2), ácido fólico, TRAIL

(LIGANDO INDUCTOR DE APOPTOSIS RELACIONADO CON TNF), NGF (factor de crecimiento nervioso) específico para un receptor de células objetivo.

5 En realizaciones adicionales preferidas, por lo menos un oligonucleótido de la invención, se puede administrar, por sí solo o en una combinación, en asociación con por lo menos una aplicación médica adicionalmente con el fin de aumentar su eficacia, preferiblemente también al facilitar la penetración de las células y/o tejidos objetivos.

10 Dicha aplicación médica se selecciona preferiblemente del grupo que consiste oxigenoterapia, magnetoterapia, termoterapia, electroestimulación, ultrasonido, radioterapia, quimioterapia y fototerapia.

10 Ejemplo 1

Síntesis química de los oligonucleótidos.

15 La síntesis química de los oligonucleótidos se basa en el uso de fosforamiditas de nucleósidos de ADN modificadas con un grupo protector, 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr) sobre 5'-OH y β -cianoetilo sobre el grupo 3'-fosfato; también se utilizan grupos protectores para las aminas primarias (heterociclos de nucleobases), que de otra manera son demasiado reactivos.

20 La síntesis química de oligonucleótidos de ADN se lleva a cabo en una dirección 3'-5'. Se hace uso de una resina GPC (acrónimo de vidrio de poro controlado) o un soporte de poliestireno, funcionalizado con la primera de las bases de nucleótidos. La síntesis comienza con una etapa de desprotección del grupo 5'-dimetoxitritilo utilizando una solución de ácido tricloroacético al 3% (TCA) en diclorometano (DCM). Esto es seguido por la activación, utilizando etiltiotetrazol (ETT) o benciltiotetrazol (BTT) 0.3 M, de la fosforamidita correspondiente a la segunda base que se inserta en la secuencia, que luego se acopla con el 5'OH previamente desprotegido, formando con ello un enlace de fosfodiéster.

25 La siguiente etapa es "recubrimiento", que sirve para acetilar los grupos 5'OH que no han reaccionado. El recubrimiento se lleva a cabo utilizando 2 soluciones, una que contiene tetrahidrofurano (THF)/lutidina/anhidrido acético (8:1:1) y la otra que contiene una solución al 10% de metilimidazol en THF. El enlace trivalente inestable de los triésteres de fosfito se estabiliza por yodo en una solución de piridina/THF que los oxida a fosfodiésteres pentavalentes.

30 Después de oxidación, el ciclo se repite, empezando con destitilación de la segunda unidad introducida y así sucesivamente. Este ciclo se repite durante el número de veces necesarias, dependiendo de cuántas bases se desea insertar en la secuencia. Por último, el grupo 5'-DMTr final se elimina por medio de un tratamiento con un ácido a temperatura ambiente.

35 Dependiendo de los grupos protectores presentes en las bases (que a su vez depende de la química de las bases seleccionadas, PTO, 2'OMe, etc.) se puede dejar a 55°C durante 16 horas con hidróxido de amonio o a 55°C durante 35 minutos con una solución de hidróxido de amonio/metilamina (AMA) con el fin de desproteger los fósforos mediante β -eliminación de los grupos cianoetilo y eliminar los grupos protectores en los heterociclos de nucleobases.

40 Alternativamente, el grupo 5'-DMTr se puede mantener durante toda la fase de análisis (HPLC, MS) y cromatografía preparativa para purificar mejor el producto final a partir de los subproductos y finalmente eliminar por medio de un tratamiento con ácido acético.

45 La síntesis química de los oligonucleótidos de ARN difiere de aquella de oligonucleótidos de ADN a causa del grupo 2'OH presente en la ribosa y por lo tanto la presencia de un grupo protector adicional para cada fosforamidita.

50 En consecuencia, la síntesis de oligonucleótidos de ARN requiere un tiempo de acoplamiento más largo y más medidas para desproteger dicho grupo.

55 El mismo protocolo descrito anteriormente se utiliza para la síntesis de oligonucleótidos con monómeros modificados químicamente, tales como fosforotioatos (PTO), 2'-metilo (2'OMe), 2'-fluoro (2'-F), ácido nucleico arabinósido (ANA), y ácido nucleico bloqueado (LNA).

60 Los detalles de las técnicas específicas para cada base modificada se proporcionan por la compañía en la que se compran las moléculas de monómero (Link Technologies Ltd.).

Los morfolinós fueron adquiridos del fabricante (Gene Tools, LLC).

65 La síntesis de oligonucleótidos PNA se llevó a cabo en una escala 10 micromol, e incluyó una etapa de purificación y caracterización.

ES 2 651 147 T3

La síntesis de la molécula se llevó a cabo en la fase sólida, utilizando una resina Rink Amide-Chemmatrix® y un sintetizador automático Syro (MultiSynTech). El cebador monómero de la síntesis se une manualmente a la resina.

5 Cada ciclo de síntesis automática se divide en tres etapas. La primera etapa es la desprotección, llevada a cabo utilizando una solución de 20% de piperidina en DMF (dimetilformamida).

10 La segunda etapa es la reacción de acoplamiento entre el monómero que entra y la cadena en crecimiento. Esta reacción se lleva a cabo al agregar 5 equivalentes 0.22 M (eq) de monómero (Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-A(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH, Fmoc-PNA-T-OH) en NMP (N-metilpirrolidona) y 4.5 equivalentes 0.32 M de un activador en DMF (en este caso HATU) en un ambiente alcalino con una solución al 8% de 2,6-lutidina y DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) en DMF. La reacción de acoplamiento se repite, por duplicado, en el punto de unión del cebador y segundo monómero sobre la resina precargada, en el paso de la cadena peptídica al PNA, y sobre el último monómero.

15 La tercera etapa es la reacción de "recubrimiento", que sirve para bloquear, mediante acetilación, los sitios que no han reaccionado durante la etapa de acoplamiento. La reacción se consigue utilizando una solución que contiene 2,6-lutidina al 6% y anhídrido acético al 5% en DMF. Luego de la terminación de la síntesis, las moléculas se retiran del soporte sólido.

20 Esta reacción se obtiene con una solución de TFA (ácido trifluoroacético) y meta-cresol en relaciones 4:1.

La molécula obtenida de esta manera se recoge mediante precipitación en éter dietílico.

25 Una vez que se recupera en agua, se purifica en HPLC. La columna utilizada para la purificación es una C18 300A 5u Jupiter (© Phenomenex, Inc.). La purificación se lleva a cabo utilizando un gradiente lineal desde 100% A (agua al 95%; acetonitrilo al 5%; 0.1% de TFA)- 0% B (agua al 60%; acetonitrilo al 40%; 0.1% de TFA) hasta 60% de A-40% de B en 30 minutos. El gradiente completo utilizado es de 0-5 minutos 0% de B; 5-35 minutos 40% de B; 35-37 100% de B; 37-42 100% de B; 42-44 0% de B.

30 Por último, el producto purificado se analiza mediante espectroscopía de masas ESI (© Waters).

Oligonucleótidos antigénicos para bloquear la transcripción de genes.

35 Para el propósito de demostrar que los oligonucleótidos de la invención, seleccionados y diseñados de acuerdo con los parámetros descritos en la presente invención, trabajan para bloquear selectivamente la transcripción de un gen, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos a base de PNA dirigidos contra el gen MYCN; los cuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	SECUENCIA DE PNA	% GC	Inhibición de ARNm (%)	Proliferación celular (%)	Proliferación Phoenix (%)	Proliferación de NIH-3T3 (%)
SEQ ID NO: 1	ATGCC <u>GGGC</u> ATGATCT	56.3	42	70	100	100
SEQ ID NO: 2	<u>GGGTGGATGC</u> GGGGG	81.3	75	32	100	100
SEQ ID NO: 3	GATGC <u>GGGGGG</u> CTCCT	75	68	41	100	100
SEQ ID NO: 4	GTC <u>GGCGGG</u> AGGTAAG	68.8	65	48	100	100
SEQ ID NO: 5	GCT <u>GGGTGGATGC</u> GGG	75	62	53	100	100
SEQ ID NO: 6	<u>TGGACGCGCTGGGTGG</u>	75	60	54	100	100
SEQ ID NO: 7	CGCGCT <u>GGGTGGATGC</u>	75	58	57	100	100
SEQ ID NO: 8	GTCT <u>GGACGCGCTGGG</u>	75	54	59	100	100
SEQ ID NO: 9	CCCTGCAGTC <u>GGCGGG</u>	81.3	51	64	100	100
SEQ ID NO: 10	<u>CGGCCGCGGGCCG</u> CCA	93.8	51	65	100	100
SEQ ID NO: 11	<u>GGGA</u> ACTGTGTTGGAG	56.3	48	68	100	100
SEQ ID NO: 12	TGTCT <u>GGACGCGCTGG</u>	68.8	47	69	100	100
SEQ ID NO: 13	ACGCTCAG <u>GGACC</u> ACG	68.8	48	66	100	100
SEQ ID NO: 14	CC <u>CGGACGA</u> AGATGAC	62.5	40	70	100	100

SEQ ID NO: 15	<u>ACTGTGTTGGAGCCGA</u>	56.3	37	77	100	100
SEQ ID NO: 16	CCTGTCGTAGACAGCT	56.3	14	90	100	100
SEQ ID NO: 17	TGTGACAGTCATCTGT	56.3	10	98	100	100
SEQ ID NO: 18	GTGACAGTCATCTGTC	50	10	98	100	100
SEQ ID NO: 19	GACAGTCATCTGTCTG	50	5	100	100	100
SEQ ID NO: 20	CGTCGATTTCTTCCTC	50	5	100	100	100
SEQ ID NO: 21	CTCGAGTTTGACTCGC	56.3	1	100	100	100
SEQ ID NO: 22	GCGCCTCCCCTGATTT	62.5	2	100	100	100
SEQ ID NO: 23	ATATCCCCCGAGCTTC	56.3	2	100	100	100

5 Los oligonucleótidos de PNA se probaron individualmente y se conjugaron con un portador en el extremo 3' y/o extremo 5' con el objetivo de favorecer la penetración en la membrana celular. En particular, los oligonucleótidos se conjugaron con el extremo carboxilo terminal en 3' con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43, es decir, prolina-lisina-lisina-lisina-arginina-lisina-valina.

10 El oligonucleótido que tiene la SEQ ID NO: 1 es la secuencia que fue el objeto de la patente EP 1618195 y representa la secuencia de control y secuencia utilizada para comparación.

15 Los oligonucleótidos que tienen la SEQ ID NO: 2-15 contienen un grupo de dos guaninas consecutivas (SEQ ID NO: 14, 15), o un grupo de tres guaninas consecutivas (SEQ ID NO: 13), o dos grupos de dos guaninas consecutivas (SEQ ID NO: 12), o un grupo de dos guaninas y un grupo de tres guaninas consecutivas (SEQ ID NO: 11, 10, 9, 8 y 7), o dos grupos de dos guaninas consecutivas y un grupo de tres guaninas consecutivas (SEQ ID NO: 6 y 4), o un grupo de dos guaninas consecutivas y dos grupos de tres guaninas consecutivas (SEQ ID NO: 5), o un grupo de seis guaninas consecutivas (SEQ ID NO: 3), o un grupo de seis guaninas consecutivas, un grupo de tres guaninas consecutivas y un grupo de dos guaninas consecutivas (SEQ ID NO: 2).

20 Los grupos de guaninas consecutivas se muestran subrayados en la Tabla 1.

Los oligonucleótidos que tienen la SEQ ID NO: 16-23 no tienen grupos de guaninas consecutivas, son controles negativos. Más aún, para el propósito de modular selectivamente la transcripción de un gen, también se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos que tienen la SEQ ID NO: 24-25; estos se muestran en la Tabla 2.

25

Tabla 2

SEQ ID NO: 24	ADN-LNA 25-1	<u>ATGCCGGGCATGATC</u> T
SEQ ID NO: 25	ADN-LNA 25-2	T <u>ATGCCGGGCATGATC</u>

5 En particular, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos quiméricos de hebra sencilla, que comprenden monómeros de ADN y monómeros de LNA (SEQ ID NO: 24 y 25).

10 Las bases de ADN en la secuencia de oligonucleótidos se muestran como bases en negrita, mientras que los monómeros de LNA están subrayados. Cada molécula de oligonucleótido quimérico se diseñó y sintetizó mediante la inserción de los monómeros de LNA separados por 1, 2 o 3 bases de ADN con el fin de evitar la rápida degradación por las nucleasas endógenas, como se ha reportado en la literatura (Koch T, Biochem J 2001, 354(Pt 3): 481-4; Koji Nagahama, Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(10): 2707-9).

Oligonucleótidos antisentido para bloquear la traducción de genes.

15 Para el propósito de demostrar que los oligonucleótidos de la invención, seleccionados y diseñados de acuerdo con los parámetros descritos en la presente invención, trabajan para bloquear selectivamente la traducción del gen objetivo, se diseñaron, analizaron los oligonucleótidos antisentido que tienen la SEQ ID NO: 26-36, dirigidas contra el gen MYCN y se analizaron experimentalmente in vitro. Se muestran en la Tabla 3.

20

Tabla 3.

SEQ ID NO		SECUENCIA CON SENTIDO		SECUENCIA ANTISENTIDO
SEQ ID NO: 26	siMYCN (795)	UGAAGAUGAUGAAGAGGAA	SEQ ID NO: 57	<u>U</u> UCCUCU <u>U</u> CAUCAUC U UCA
SEQ ID NO: 27	siMYCN (799)	GAUGAUGAAGAGGAAGAUG	SEQ ID NO: 58	CA U <u>U</u> CCUCU <u>U</u> CAU CA UC
SEQ ID NO: 28	siMYCN (801)	UGAUGAAGAGGAAGAUGAA	SEQ ID NO: 59	<u>U</u> UCAUCU <u>U</u> CCUCU <u>U</u> C A UCA
SEQ ID NO: 29	siMYCN (808)	GAGGAAGAUGAAGAGGAAG	SEQ ID NO: 60	<u>C</u> U <u>U</u> CCUCU <u>U</u> CAUCU <u>U</u> CC UC
SEQ ID NO: 30	siMYCN (810)	GGAAGAUGAAGAGGAAGAA	SEQ ID NO: 61	<u>U</u> U <u>U</u> CCUCU <u>U</u> CAUC U UCC
SEQ ID NO: 31	MYCN-PTO (1) as			C G <u>T</u> G <u>G</u> A <u>G</u> CAGCTCGG C A <u>T</u>
SEQ ID NO: 32	MYCN-PTO (763) as			C A <u>G</u> G <u>T</u> G <u>T</u> CCTCTCC G G <u>A</u>
SEQ ID NO: 33	siARN-2'-OMe-ARN 808	<u>GAGGAAGAUGAAGAGGAAG</u> TT	SEQ ID NO: 62	<u>C</u> U <u>U</u> CCUCU <u>U</u> CAUCU <u>U</u> CC UC <u>TT</u>
SEQ ID NO: 34	siARN-2'-F-ARN 808	<u>CAGGAAGAUGAAGAGGAAG</u> UU	SEQ ID NO: 63	<u>G</u> U <u>U</u> CCUCU <u>U</u> CAUCU <u>U</u> CC UCU <u>U</u>
SEQ ID NO: 35	siARN-LNA 808	<u>GAGGAAGAUGAAGAGGAAG</u> TT	SEQ ID NO: 64	<u>C</u> U <u>U</u> CCUCU <u>U</u> CAUCU <u>U</u> CC UC <u>TT</u>
SEQ ID NO: 36	siARN-ANA 808	<u>CAGGAAGAUGAAGAGGAAG</u> AA	SEQ ID NO: 65	<u>G</u> U <u>U</u> CCUCU <u>U</u> CAUCU <u>U</u> CC UCA <u>A</u>

25 Los oligonucleótidos de doble hebra complementarios basados en ARN (ARN de interferencia pequeño (ARNsi) (SEQ ID NO : 26-30) fueron producidos para modular selectivamente la traducción del gen objetivo, MYCN.

Más aún, se produjeron oligonucleótidos a base de ADN SEQ ID NO: 31 y 32, en los que se modificó el enlace de fosfodiéster en fosforotioato.

5 También se producen oligonucleótidos quiméricos de doble hebra: con base en monómeros de ARN y monómeros 2'-Metilo (SEQ ID NO: 33); con base en monómeros de ARN y monómeros 2'-Fluoro (SEQ ID NO: 34); con base en monómeros de ARN y monómeros de LNA (SEQ ID NO: 35) y con base en monómeros de ARN y monómeros de ARN de arabinósido (SEQ ID NO: 36). En las secuencias de oligonucleótidos SEQ ID NO: 33-36, los monómeros 2'-Metilo, 2'-Fluoro, LNA y arabinósido (ANA) se muestran en negrita, mientras que se subraya cada grupo de por lo menos dos guaninas consecutivas.

10 Ya que el ARNsi de los oligonucleótidos es de doble hebra, la quimera se diseñó y sintetizó de tal manera que lleva dos monómeros 2'-o-Me, o dos monómeros 2'-fluoro, o dos monómeros de LNA, o dos monómeros de ARN arabinósido, tanto en 3' como en 5', no emparejados con la cadena complementaria y de ese modo evitar la rápida degradación por las enzimas celulares.

Tratamientos con oligonucleótidos-QT-PCR

15 Para el propósito de evaluar la capacidad de los oligonucleótidos de la presente invención para modular la expresión de los genes objetivo, su capacidad para reducir la cantidad de ARN mensajero se analizó utilizando la técnica PCR en tiempo real.

20 Para este propósito, se hizo uso de placas de 24 pozos, que se sembraron con 5.0×10^4 células con 0.3 ml de medio OPTI-MEM (GIBCO BRL), 4% de FBS y L-glutamina 2 mM (experimentos por triplicado) por pozo.

Se incubaron las células durante 24 horas a 37°C, en una atmósfera que contiene 5% de CO₂ para permitir la adherencia a la base de los pozos.

25 Cada oligonucleótido se analizó, a excepción de los oligonucleótidos de PNA, se incubó previamente con 2 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen), con 0.3 mL de suero libre de medio OPTI-MEM (GIBCO BRL).

Para cada pozo, los oligonucleótidos se analizaron en las siguientes concentraciones finales:

30 • Los oligonucleótidos antisentido de ARNsi y gápmero de ARNsi (es decir, los oligonucleótidos que contienen uno o más monómeros de ácidos nucleicos modificados químicamente en el extremo 3' o 5' y, mientras que en la porción central tienen monómeros de ácidos nucleicos que no han sido modificados o han sido modificados a nivel del enlace fosfodiéster como un enlace fosforotioato) se utilizaron a 200 nM;

35 • se utilizaron oligonucleótidos antisentido que contienen monómeros de ADN de fosforotioato, oligonucleótidos de antígenos de ARN (ARNag) y oligonucleótidos que contienen monómeros de ADN y monómeros de LNA a 10 µM;
• se utilizaron oligonucleótidos de morfolino a una concentración de 1 µM, y

40 • se administraron oligonucleótidos PNA a una concentración de 1 µM.

Las células se trataron con oligonucleótidos, al agregar FBS hasta el 4% 6 horas después de la administración de la misma. Después de 24 horas el ARN total se extrajo de cada pozo y se purificó utilizando el Kit RNeasy Mini (QIAGEN).

45 Los ensayos se realizaron en 8 estirpes celulares obtenidas a partir de 5 tumores humanos diferentes que se correlacionan con la expresión MYCN, es decir:

50 • como un modelo de neuroblastoma se hace uso de las estirpes celulares Kelly, IMR-32 (en las que el gen MYCN se amplifica y se sobreexpresa) y SKNBE2c y LAN1 (en las que el gen MYCN se amplifica y se sobreexpresa y se muta el gen p53);

• como un modelo de rhabdomiocarcinoma se hace uso de la estirpe celular RH30, en la que el gen MYCN se amplifica y se sobreexpresa,;

55 • como un modelo de tumor de Wilms se hace uso de la estirpe celular WIT49, en la que el gen MYCN se amplifica y se sobreexpresa;

• como un modelo de retinoblastoma se hace uso de la estirpe celular Y79, en la que el gen MYCN se amplifica y se sobreexpresa; y

60 • como un modelo de cáncer de pulmón de células pequeñas se hace uso de la estirpe celular H69 en la que el gen MYCN se amplifica y se sobreexpresa.

65 Como control, se hizo uso de las mismas estirpes celulares como se indicó anteriormente se trataron con agua estéril en lugar de oligonucleótidos. Cada muestra de ARN se cuantificó (por duplicado) utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

La primera hebra de ADNc se produjo utilizando el kit de síntesis de ADNc para la RT-PCR (Roche). Para la reacción de síntesis de ADNc se utilizó un total de 1 µg de ARN. Para la PCR en tiempo real, se utilizó 10 ng de ADNc en un volumen final de 20 µl con SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems) (3 experimentos idénticos se llevaron a cabo por triplicado). Las secuencias y las concentraciones del cebador utilizado para llevar a cabo la PCR en tiempo real se muestran en la Tabla 4. Dos genes de limpieza se utilizaron como controles positivos: GAPDH y beta-actina (ACTB).

Las condiciones de la reacción QT-PCR fueron: 10 min a 95°C, 20 segundos a 95°C, y 30 segundos a 60°C, durante 50 ciclos.

Tabla 4

Cebador	Secuencia	Concentración	SEQ ID NO
MYCN con sentido	CGACCACAAGGCCCTCAGT	300 nM	SEQ ID NO: 37
MYCN antisentido	TGACCACGTCGATTTCTTCCT	300 nM	SEQ ID NO: 38
ACTB con sentido	GAGCACAGAGCCTCGCCTTTG	300 nM	SEQ ID NO: 39
ACTB antisentido	ACCATCACGCCCTGGTGCCTG	300 nM	SEQ ID NO: 40
GAPDH con sentido	CCAATATGATTCCACCCATGGC	300 nM	SEQ ID NO: 41
GAPDH antisentido	CTTGATTTTGGAGGGATCTCGC	300 nM	SEQ ID NO: 42

Tratamientos con oligonucleótidos - ensayo de proliferación celular.

Para el propósito de evaluar a capacidad de modulación de gen de los oligonucleótidos de la presente invención, se determinó el efecto de su administración sobre la viabilidad celular.

Para este propósito se sembraron 5×10^3 células por pozo en placas de cultivo celular de 96 pozos (experimentos llevados a cabo por triplicado) con 100 µl de OPTI-MEM (GIBCO BRL) que contenía 4% de FBS y 2 mM de L-glutamina.

Los oligonucleótidos de PNA se administraron a diferentes concentraciones (1 µM-2.5 µM-5 µM-10 µM) con el fin de observar una relación dosis-efecto.

Por lo que respecta a todos los otros oligonucleótidos, las concentraciones a las que administraron se enumeran en el párrafo:

Tratamientos con oligonucleótidos - QT-PCR.

La viabilidad de las células tratadas se determinó a 48, 72, 96 y 168 horas después del tratamiento.

La viabilidad celular se evaluó por medio de un ensayo de ATP-Lite (Sistema de ensayo de detección de ATP con luminiscencia, PerkinElmer) y se reporta como la relación entre la señal media de los pozos tratados en comparación con el valor medio de los pozos de células control no tratadas. Las células se procesaron siguiendo las instrucciones proporcionadas con el kit.

Los ensayos se realizaron en las mismas estirpes celulares utilizadas para determinar los niveles del mensajero del gen MYCN y se enumeran en el párrafo: Tratamientos con oligonucleótidos - QT-PCR.

Resultados

En lo que se refiere a los oligonucleótidos de PNA, los resultados en cuanto a su capacidad para inhibir la transcripción del gen y la proliferación de células Kelly MYCN se muestran en la Tabla 1. La Tabla 6 muestra los valores (en forma de porcentaje) de la proliferación células Kelly en las diferentes concentraciones de PNA analizadas.

Tabla 5

SEQ ID NO	Secuencia	Proliferación celular (%) 1 μ M 72h	Proliferación celular (%) 2,5 μ M 72h	Proliferación celular. (%) 5 μ M 72h	Proliferación celular. (%) 10 μ M 72h
SEQ ID NO: 1	<u>ATGCCGGGCATGAT</u> <u>CT</u>	89	66	50	24
SEQ ID NO: 2	<u>GGGTGGATGCCGGG</u> <u>GG</u>	74	32	12	2
SEQ ID NO: 3	<u>GATGCCGGGGGCTC</u> <u>CT</u>	78	41	19	3
SEQ ID NO: 4	<u>GTCGGCGGGAGGTA</u> <u>AG</u>	78	48	21	3
SEQ ID NO: 5	<u>GCTGGGTGGATGCC</u> <u>GG</u>	79	53	27	5
SEQ ID NO: 6	<u>TGGACGCGCTGGGT</u> <u>GG</u>	82	59	35	13
SEQ ID NO: 7	<u>CGCGCTGGGTGGAT</u> <u>GC</u>	80	54	31	8
SEQ ID NO: 8	<u>GTCTGGACGCGCTG</u> <u>GG</u>	80	57	32	11
SEQ ID NO: 9	<u>CCCTGCAGTCGGCG</u> <u>GG</u>	86	64	42	20
SEQ ID NO: 12	<u>TGTCTGGACGCGCT</u> <u>GG</u>	84	60	40	16

- 5 Los resultados demuestran que el efecto de inhibición de estos PNA sobre la proteína traducida de los genes objetivos es altamente selectivo y específico. Más aún, se observó que la detención del crecimiento de las células tumorales utilizadas como modelo (caracterizado por amplificación del gen MYCN) fue seguida directamente por la apoptosis luego de la administración de los PNA antigénicos.
- 10 En general, los oligonucleótidos antigénicos de PNA que tienen la SEQ ID: 2-SEQ ID NO: 13 (que contienen uno o más grupos de Gs) tienen mayor efectividad antigénica (es decir inhibición de ARNm de MYCN y de la proliferación de células tumorales con la expresión de MYCN) en comparación con oligonucleótidos de PNA desprovistos de grupos de Gs (SEQ ID NO: 16-SEQ ID NO: 23).
- 15 En particular, los resultados mostrados en la Tabla 1 y en la Tabla 5 demuestran que las secuencias SEQ ID NO: 2-SEQ ID NO: 13 tienen mayor efectividad antigénica que la secuencia SEQ ID NO: 1, el objeto de la patente EP 1618195.
- 20 Las secuencias SEQ ID NO: 7-SEQ ID NO: 12 (que contienen dos grupos de dos o tres Gs consecutivos) muestran mayor efectividad antigénica que las secuencias SEQ ID NO: 1, y SEQ ID NO: 13-SEQ ID NO: 15 (que contienen solo un grupo de dos o tres Gs consecutivos).
- 25 Las secuencias SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 6 (que contienen tres grupos de dos o tres Gs consecutivos) muestran mayor efectividad antigénica que las secuencias SEQ ID NO: 7-SEQ ID NO: 12 (que contienen dos grupos de dos o tres Gs consecutivos).
- 30 La SEQ ID NO: 3, que contiene un grupo de seis Gs consecutivos, muestra mayor efectividad antigénica que las secuencias SEQ ID NO: 1 y secuencias SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 12 (que contienen uno o dos o tres grupos de Gs (en os que cada grupo consiste de a lo sumo dos o tres Gs consecutivos).
- 35 Secuencia SEQ ID NO: 2, que contiene tres grupos de Gs consecutivos, que, además de dos grupos de dos y tres Gs consecutivos, también comprende un grupo de seis Gs consecutivos, muestra mayor efectividad antigénica que la SEQ ID NO: 3, que contiene solo un grupo de seis Gs, y las secuencias SEQ ID NO: 1 y secuencias SEQ ID NO: 4- SEQ ID NO: 12 que contienen un o dos o tres grupos de Gs (en os que cada grupo consiste de a lo sumo dos o tres Gs consecutivos).

Más aún, los oligonucleótidos que tienen la SEQ ID NO 1-23 se administraron en estirpes celulares de tipo fibroblastoide (NIH-3T3 y Phoenix) y los resultados se muestran en la Tabla 1 (las dos últimas columnas).

5 Los resultados demuestran claramente que los oligonucleótidos analizados no son específicamente eficaces contra y no son tóxicas para estas células (es decir, células que no expresan el gen objetivo, que en este caso es MYCN).

10 De hecho, no se observaron cambios en la proliferación celular en estas dos estirpes de fibroblastos no tumorales, y este resultado significa que los oligonucleótidos PNA actúan con un efecto específico de la inhibición de la expresión de MYCN, mientras que no tienen un efecto específico de, tóxico en las células que no expresan MYCN.

15 Por lo tanto, se puede deducir que los oligonucleótidos de PNA diseñados sobre la base de los parámetros descritos en la presente invención actúan específicamente y eficazmente sobre el gen objetivo y por lo tanto sobre las células que expresan/sobreexpresan este gen.

20 Los PNA que tienen la SEQ ID NO: 1-12 también se ensayaron en diferentes estirpes celulares que sobreexpresan MYCN (Kelly, SKNBE2c, RH30, WiT49, WERI-Rb1 y H69). Los resultados se muestran en la Tabla 6 y confirman la selectividad y especificidad del efecto de inhibición de los PNA sobre el producto de traducción de la proteína del gen MYCN.

Tabla 6

SEQ ID NO	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
Kelly % ARNm	48	75	68	65	62	60	58	54	51	51	50	50
Kelly % Proliferación celular	66	32	41	48	53	54	57	59	60	64	64	65
SKNBE2c % ARNm	41	75	68	60	59	62	60	62	58	41	40	40
SKNBE2c % Proliferación celular	72	52	53	59	64	57	58	56	64	70	71	71
RH30 % ARNm	39	74	65	57	56	56	55	58	50	29	31	32
RH30 % Proliferación celular	76	56	59	62	64	64	63	60	71	80	78	77
WiT49 % ARNm	62	78	75	73	69	68	70	72	66	60	60	62
WiT49 % Proliferación celular	74	54	57	60	63	65	60	62	68	70	72	73
WERI-Rb1 % ARNm	31	46	43	41	38	37	38	40	36	30	30	30
WERI-Rb1 % Proliferación celular	82	79	78	79	80	80	79	78	79	85	84	84
H69 % ARNm	40	58	55	55	54	55	55	56	50	41	41	40

H69												
Proliferación celular %	77	61	63	66	68	69	67	66	70	79	78	78

El oligonucleótido de PNA antigénico que tiene la SEQ ID NO: 5 se analizó de una manera más detallada.

- 5 En particular, los oligonucleótidos modificados, en los que se modificaron los grupos de guaninas consecutivas presentes en la secuencia (los grupos de guaninas consecutivas están subrayados, mientras que los nucleótidos modificados están en negrita) con el fin de interrumpir la consecutividad de las guaninas, se sintetizaron y se analizaron in vitro en células Kelly (que sobreexpresan MYCN).
- 10 Los resultados (resumidos en la Tabla 7) demuestran claramente el hecho de que las guaninas que son consecutivas es de fundamental importancia para los propósitos de la actividad de modulación de la expresión del gen. De hecho, el PNA que tiene la SEQ ID NO: 43, en la que todos los grupos de guaninas consecutivas de los PNA que tienen la SEQ ID NO: 5 se mutaron, hace que la actividad inhibidora de los PNA se pierda, mientras que la mutación de uno o dos de los tres grupos de guaninas consecutivas compromete considerablemente, pero no
- 15 suprime por completo, la actividad inhibidora de la molécula.

Tabla 7

SEQ ID NO	SECUENCIA	Inhibición de ARNm (%) (Kelly)	% de proliferación celular (Kelly)
SEQ ID NO: 5	GCTGGGTGGATGCGGG	62	53
SEQ ID NO: 43	GCTGAGTCGATGCGTG	0	100
SEQ ID NO: 44	GCTGAGTGGATGCGTG	25	89
SEQ ID NO: 45	GCTGGGTTCGATGCGGG	47	69
SEQ ID NO: 46	GTTGGGTGGATGTGGG	58	60

- 20 Los oligonucleótidos quiméricos que comprenden monómeros de ADN y monómeros de LNA y que tienen el gen MYCN como su objetivo se evaluaron in vitro sobre células de rhabdomyosarcoma alveolar (RH30). Los resultados se resumen en la Tabla 8 y demuestran que estos oligonucleótidos tienen una actividad antigénica intensa, específica.

Tabla 8

25

SEQ ID NO	Nombre	SECUENCIA	Inhibición de ARNm (%)	Proliferación celular. (%)
SEQ ID NO: 24	ADN-LNA 25-1	<u>ATGCCGGGCATGA</u> TCT	23	75
SEQ ID NO: 25	ADN-LNA 25-2	<u>ATGCCGGGCATGA</u> TCT	24	78

- 30 Los oligonucleótidos antisentido diseñados y sintetizados por el Solicitante de acuerdo con los parámetros descritos en la presente invención se analizaron in vitro en células de rhabdomyosarcoma (RH30). Los resultados se resumen en la Tabla 9 y demuestran que los oligonucleótidos son capaces de inhibir la transcripción de MYCN de una manera específica y efectiva; más aún, también son capaces de inhibir selectivamente la proliferación de células tumorales de una manera más efectiva que los oligonucleótidos antisentido estándar actualmente disponibles para el gen MYCN (Chung DH, Bioch Bioph Res Commun, 2006, 351(1): 192-7).

- 35 En particular, el ARNsi identificado por el Solicitante y dirigido contra ARNm de MYCN, descrito en la Tabla 11, ejerce una actividad antisentido con una inhibición de ARNm de MYCN que va desde un mínimo de 70% hasta un máximo de 85%.

Tabla 9

SEQ ID NO		SECUENCIA CON SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO	Inhibición de ARNm (%)	Proliferación celular (%)
SEQ ID NO: 26	siMYCN (795)	<u>UGAAGAUGAU</u> <u>GAAGAGGAA</u>	<u>UUCUCUUCA</u> <u>UCAUCUUCA</u>	82	28
SEQ ID NO: 27	siMYCN (799)	<u>GAUGAUGAAG</u> <u>AGGAAGAUG</u>	<u>CAUCUCCUC</u> <u>UUCAUCAUC</u>	70	43
SEQ ID NO: 28	siMYCN (801)	<u>UGAUGAAGAG</u> <u>GAAGAUGAA</u>	<u>UUCAUCUCC</u> <u>UCUUCAUCA</u>	78	35
SEQ ID NO: 29	siMYCN (808)	<u>GAGGAAGAUG</u> <u>AAGAGGAAG</u>	<u>CUUCCUCUUC</u> <u>AUCUCCUC</u>	85	28
SEQ ID NO: 30	siMYCN (810)	<u>GGAAGAUGAA</u> <u>GAGGAAGAA</u>	<u>UUCUCCUCU</u> <u>UCAUCUCC</u>	81	30
SEQ ID NO: 31	MYCN-PTO (1) as		<u>CGTGGAGCAG</u> <u>CTCGGCAT</u>	34	73
SEQ ID NO: 32	MYCN-PTO (763) as		<u>CAGGGTGTCC</u> <u>TCTCCGGA</u>	45	65
SEQ ID NO: 33	siARN-2'-OMe-ARN 808	<u>GAGGAAGAUG</u> <u>AAGAGGAAGT</u> <u>T</u>	<u>CUUCCUCUUC</u> <u>AUCUCCUCT</u> <u>T</u>	13	85
SEQ ID NO: 34	siARN-2'F-ARN 808	<u>CAGGAAGAUG</u> <u>AAGAGGAAGU</u> <u>U</u>	<u>GUUCCUCUUC</u> <u>AUCUCCUCU</u> <u>U</u>	59	52
SEQ ID NO: 35	siARN-LNA 808	<u>GAGGAAGAUG</u> <u>AAGAGGAAGT</u> <u>T</u>	<u>CUUCCUCUUC</u> <u>AUCUCCUCT</u> <u>T</u>	34	68
SEQ ID NO: 36	siARN-ANA 808	<u>CAGGAAGAUG</u> <u>AAGAGGAAGA</u> <u>A</u>	<u>GUUCCUCUUC</u> <u>AUCUCCUCA</u> <u>A</u>	69	35

5 Para el propósito de verificar si los oligonucleótidos de la presente invención son capaces de reducir las concentraciones de los agentes quimioterapéuticos utilizados actualmente en los protocolos terapéuticos contra el cáncer, los mismos se administran en concomitancia con fármacos quimioterapéuticos.

10 Se realizaron estudios sobre el efecto de las asociaciones entre PNA y fármacos de quimioterapia drogas (carboplatino, etopósido (VP16), cisplatino y vincristina) en diferentes estirpes celulares tumorales de neuroblastoma humano y de ratón (SMS-KAN, LAN 1, IMR-32, SMS -KCN, Kelly, NHO2A, SKNBE2c).

15 El esquema terapéutico utilizado en los tratamientos realizados proporcionó las células a ser tratadas con PNA y luego después, en un momento preestablecido (que podría ser de 6 o 12 horas), se administró el agente quimioterapéutico.

Los resultados demuestran que la asociación de estos compuestos con los oligonucleótidos de la invención determina, en intervalos de concentración específicos, un mayor efecto terapéutico que los tratamientos individuales con los mismos compuestos.

20 En particular, se puede observar que el tratamiento - ya sea concomitante y simultáneo o en diferentes intervalos de tiempo (3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, etc.) - con una combinación que consiste en los oligonucleótidos de la invención y otros compuestos con un efecto farmacológico sirve para mejorar el efecto terapéutico deseado.

25 Por lo tanto, la combinación de uno o más de los oligonucleótidos identificados por el Solicitante con los fármacos de quimioterapia hace posible reducir la concentración del fármaco de quimioterapia por tanto como 10 veces en comparación con la presente concentración terapéutica estándar, mientras que todavía se obtiene el mismo efecto.

En particular, los resultados de este estudio demuestran que la SEQ ID NO: 1 tiene un efecto sinérgico, en términos de inhibición de la proliferación celular, cuando se administra en combinación con vincristina, o etopósido, o carboplatino, o cisplatino, en comparación con los efectos obtenidos en los tratamientos con el oligonucleótido o con los agentes quimioterapéuticos mencionados anteriormente por su propia cuenta.

Ejemplo 2

Con el propósito de apoyar la presente invención, también se sintetizaron los oligonucleótidos resumidos en la Tabla 10. En particular, la Tabla 10 muestra las secuencias de oligonucleótidos, la SEQ ID NO, el valor del porcentaje del contenido (G+C) y el gen de los oligonucleótidos sintetizados que se dirigen contra. se logró la síntesis de los oligonucleótidos como en el ejemplo 1.

Tabla 10

	SEQ ID NO		% GC
MYCN	SEQ ID NO: 66	TCGGGAGCAGTGGGCA	68.8
	SEQ ID NO: 67	GCGGGTCGCGGGCACG	87.5
	SEQ ID NO: 68	TGGAGGTCGGCGCCGG	81.3
	SEQ ID NO: 69	TCGGCGGGAGGTAAGG	68.8
MYC	SEQ ID NO: 70	CTCAGAGGCTTGGCGG	68.8
	SEQ ID NO: 71	GCGGCCGGCTAGGGTG	81.3
	SEQ ID NO: 72	CGGCCGGCTAGGGTGG	81.3
	SEQ ID NO: 73	CGACGGCGGTGGCGGG	87.5
	SEQ ID NO: 74	GGACGGGGGCGGTGGA	81.3
BIR C5	SEQ ID NO: 75	GCGGCGGCATGGGTGC	81.3
	SEQ ID NO: 76	GGCGGCGGCATGGGTG	81.3
ALK	SEQ ID NO: 77	GCAGGAGAGGACGGTA	62.5
	SEQ ID NO: 78	CAGGAGAGGACGGTAC	62.5
	SEQ ID NO: 79	GGCAGGAGAGGACGGT	68.8
BCL2	SEQ ID NO: 80	GGATGGCGCACGCTGG	75.0
	SEQ ID NO: 81	GGGAAGGATGGCGCAC	68.8
	SEQ ID NO: 82	CCACGGTGGTGGAGGA	68.8
PLK 4	SEQ ID NO: 83	ACGGCAAGCGGCGGGA	75.0
	SEQ ID NO: 84	GGACGGCAAGCGGCGG	81.3

En particular, se sintetizaron las siguientes: SEQ ID NO: 66-69 dirigidas contra MYCN, SEQ ID NO: 70-74 dirigidas contra MYC, SEQ ID NO: 75, 76 dirigidas contra BIRC5, SEQ ID NO: 77-79 dirigidas contra ALK, SEQ ID NO: 80-82 dirigidas contra BCL2 y SEQ ID NO: 83, 84 dirigidas contra PLK4.

Los oligonucleótidos se probaron in vitro (a una concentración de 2.5 µM) para determinar su capacidad para inhibir la transcripción del gen que se dirigen contra al medir los niveles del mensajero de genes en modelos celulares en los cuales se sobreexpresa el gen de interés. Los métodos utilizados son los descritos en el ejemplo 1.

En particular, se probaron in vitro las SEQ ID NO: 66-69 (dirigidas contra MYCN) en las estirpes celulares Kelly y H69; se probaron in vitro las SEQ ID NO: 70-74 (dirigidas contra MYC) en las estirpes celulares H82 y RD, se probaron in vitro en SEQ ID NO: 75, 76 (dirigidas contra BIRC5) la estirpe celular Kelly, se probaron in vitro SEQ ID NO: 77-79 (dirigidas contra ALK) en la estirpe celular Kelly, se probaron in vitro la SEQ ID NO: 80-82 (dirigidas contra BCL2) en la estirpe celular Kelly y se probaron in vitro las SEQ ID NO: 83, 84 (dirigidos contra PLK4) en la estirpe celular Kelly.

Se midió la capacidad de los oligonucleótidos probados para inhibir el mensajero del gen de interés y también se evaluó la capacidad proliferativa de las células después de la administración de los oligonucleótidos. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Los datos muestran una potente actividad inhibidora contra el ARNm del gen objetivo y una inhibición de la proliferación celular que se eleva con los aumentos en el número de grupos de Gs presente en la secuencia del oligonucleótido.

5

Tabla 11

	SEQ ID NO		Inhibición de ARNm (%)	Proliferación celular (%)
MYCN Kelly	SEQ ID NO: 66	TCGGGAGCAGTGGGC A	57	60
	SEQ ID NO: 67	GCGGGTCGCGGGCAC G	60	56
	SEQ ID NO: 68	TGGAGGTCGGCGCCG G	74	35
	SEQ ID NO: 69	TCGGCGGGAGGTAAG G	76	30
MYCN H69	SEQ ID NO: 66	TCGGGAGCAGTGGGC A	41	73
	SEQ ID NO: 67	GCGGGTCGCGGGCAC G	42	71
	SEQ ID NO: 68	TGGAGGTCGGCGCCG G	62	49
	SEQ ID NO: 69	TCGGCGGGAGGTAAG G	67	45
MYC H92	SEQ ID NO: 70	CTCAGAGGCTTGGCG G	43	79
	SEQ ID NO: 71	GCGGCCGGCTAGGGT G	46	75
	SEQ ID NO: 72	CGGCCGGCTAGGGTG G	52	64
	SEQ ID NO: 73	CGAOGGCGGTGGCGG G	56	65
	SEQ ID NO: 74	GGACGGGGGCGGTGG A	61	61
MYC RD	SEQ ID NO: 70	CTCAGAGGCTTGGCG G	34	73
	SEQ ID NO: 71	GCGGCCGGCTAGGGT G	42	65
	SEQ ID NO: 72	CGGCCGGCTAGGGTG G	58	53
	SEQ ID NO: 73	CGAOGGCGGTGGCGG G	59	51
	SEQ ID NO: 74	GGACGGGGGCGGTGG A	64	47
BIRC5 Kelly	SEQ ID NO: 75	GCGGCGGCATGGGTG C	69	43
	SEQ ID NO: 76	GGCGGCGCATGGGT G	78	35

ALK Kelly	SEQ ID NO: 77	<u>GCAGGAGAGGACGGT</u> A	57	55
	SEQ ID NO: 78	<u>CAGGAGAGGACGGTA</u> C	68	46
	SEQ ID NO: 79	<u>GGCAGGAGAGGACGG</u> T	79	39
BCL2 Kelly	SEQ ID NO: 80	<u>GGATGGCGCACGCTG</u> G	59	62
	SEQ ID NO: 81	<u>GGGAAGGATGGCGCA</u> C	62	58
	SEQ ID NO: 82	<u>CCACGGTGGTGGAGG</u> A	68	55
PLK4 Kelly	SEQ ID NO: 83	<u>ACGGCAAGCGGCGGG</u> A	62	59
	SEQ ID NO: 84	<u>GGACGGCAAGCGGCG</u> G	74	49

Finalmente, los oligonucleótidos que tienen la SEQ ID NO 66-8 se administraron en las estirpes celulares de un tipo fibroblastoide (Phoenix y NIH-3T3). En estas células, los oligonucleótidos probados no mostraron ser tóxicos.

5 Estos resultados indican que los oligonucleótidos de PNA actúan a través de un efecto de inhibición específico sobre la expresión del gen de interés, mientras que no tienen ningún efecto no específico, tóxico en las células que no expresan el gen.

10 Por lo tanto se puede deducir que los oligonucleótidos de PNA diseñados sobre la base de los parámetros descritos en la presente invención actúan específicamente y efectivamente sobre el gen objetivo y por lo tanto sobre las células que expresan/sobreexpresan este gen.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Biogenera srl
 Tonelli, Roberto
 Venturelli, Leonardo
 Tortori, Andrea
 Montemurro, Lucy

10 <120> Oligonucleótidos para la modulación de expresión génica y usos de los mismos
 <130> 21.B0278.12.IT.2
 <160> 84
 15 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 16
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN
 25 <400> 1
 atgccgggca tgatct 16
 <210> 2
 30 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> PNA ANTI MYCN
 <400> 2
 gggatgatgc gggggg 16
 40 <210> 3
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN
 <400> 3
 50 gatgcggggg gctcct 16
 <210> 4
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN
 <400> 4
 60 gtcggcggga ggtaag 16
 <210> 5
 <211> 16
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 5
 5 gctgggtgga tgcggg 16

 <210> 6
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 6
 15 tggacgcgct gggtag 16

 <210> 7
 <211> 16
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN
 25
 <400> 7
 cgcgctgggt ggatgc 16

 <210> 8
 <211> 16
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN
 35
 <400> 8
 gtctggacgc gctggg 16

 <210> 9
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 9
 50 ccctgcagtc ggcggg 16

 <210> 10
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 10
 60 cggccgcggg ccgcca 16

 <210> 11
 <211> 16
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 11
 5 ggaactgtg ttggag 16

 <210> 12
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 15 <400> 12
 tgtctggacg cgctgg 16

 <210> 13
 <211> 16
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN
 25
 <400> 13
 acgctcaggg accacg 16

 <210> 14
 30 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 14
 cccggacgaa gatgac 16

 40 <210> 15
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 15
 50 actgtgttg agccga 16

 <210> 16
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 16
 60 cctgtcgtag acagct 16

 <210> 17
 <211> 16
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 17
 5 tgtgacagtc atctgt 16

 <210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 15 <400> 18
 gtgacagtca tctgtc 16

 <210> 19
 <211> 16
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN
 25
 <400>19
 gacagtcac tgctg 16

 <210> 20
 30 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 20
 cgtcgatttc ttctc 16

 40 <210> 21
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 21
 50 ctcgagttg actcgc 16

 <210> 22
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 22
 60 gcgcctcccc tgattt 16

 <210> 23
 <211> 16
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> PNA ANTI MYCN

 <400> 23
 5 atatcccccg agcttc 16

 <210> 24
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> ANTI MYCN ADN/LNA

 <400> 24
 15 atgccgggca tgatct 16

 <210> 25
 <211> 16
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> ANTI MYCN ADN/LNA

 <400> 25
 25 atgccgggca tgatct 16

 <210> 26
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siMYCN (795)

 <400> 26
 35 ugaagaugau gaagaggaa 19

 <210> 27
 <211> 19
 <212> ARN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siMYCN (799)

 <400> 27
 45 gaugaugaag aggaagaug 19

 <210> 28
 <211> 19
 <212> ARN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siMYCN (801)

 <400> 28
 55 ugaugaagag gaagaugaa 19

 <210> 29
 <211> 19
 <212> ARN
 60 <213> Artificial

 65

<220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siMYCN (808)

5 <400> 29
 gaggaagaug aagaggaag 19

<210> 30
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siMYCN (810)

15 <400> 30
 ggaagaugaa gaggaagaa 19

<210> 31
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO MYCN-PTO (1)

25 <400> 31
 cgtggagcag ctccgcat 18

30 <210> 32
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO MYCN-PTO (763)

<400> 32
 caggggtgcc tctccgga 18

40 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siARN-2'-OMe-ARN 808

<400> 33
 50 gaggaagaug aagaggaagt t 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siARN-2'F-ARN 808

<400> 34
 60 caggaagaug aagaggaagu u 21

<210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siARN-LNA 808

 <400> 35
 5 gaggaagaug aagaggaagt t 21

 <210> 36
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siARN-ANA 808

 <400> 36
 15 caggaagaug aagaggaaga a 21

 <210> 37
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CEBADOR MYCN CON SENTIDO
 25
 <400> 37
 cgaccacaag gccctcagt 19

 <210> 38
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CEBADOR MYCN ANTISENTIDO
 35
 <400> 38
 tgaccacgtc gattcttcc t 21

 <210> 39
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CEBADOR ACTB CON SENTIDO
 45
 <400> 39
 50 gagcacagag cctcgcctt g 21

 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> CEBADOR ACTB ANTISENTIDO

 <400> 40
 60 accatcacgc cctggtgcct g 21

 <210> 41
 <211> 22
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> CEBADOR GAPDH CON SENTIDO

 <400> 41
 5 ccaatatgat tccacccatg gc 22

 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> CEBADOR GAPDH ANTISENTIDO

 15 <400> 42
 ctgattttg gagggatctc gc 22

 <210> 43
 <211> 16
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> SEQ ID NO: 5 MODIFICADA
 25
 <400> 43
 gctgagtcga tgcgtg 16

 <210> 44
 30 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> SEQ ID NO: 5 MODIFICADA

 <400> 44
 gctgagtgga tgcgtg 16

 40 <210> 45
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> SEQ ID NO: 5 MODIFICADA

 <400> 45
 50 gctgggtcga tgcggg 16

 <210> 46
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> SEQ ID NO: 5 MODIFICADA

 <400> 46
 60 gttgggtgga tgtggg 16

 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> PÉPTIDO PORTADOR

 <400> 47

 5 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

 <210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> PÉPTIDO PORTADOR

 15 <400> 48

 Val Lys Arg Lys Lys Lys Pro
 1 5

 <210> 49
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> PÉPTIDO PORTADOR

 25 <400> 49

 Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 1 5

 <210> 50
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> PÉPTIDO PORTADOR

 35 <400> 50

 Pro Lys Arg Lys Arg Lys Val
 1 5

 40 <210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> PÉPTIDO PORTADOR

 <400> 51

 Lys Arg Lys Arg Lys Arg Lys
 1 5

 50 <210> 52
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> PÉPTIDO PORTADOR

<400> 52

Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

5 <210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> PÉPTIDO PORTADOR

<400> 53

Pro Lys Lys Lys Arg Lys
1 5

15 <210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> PÉPTIDO PORTADOR

<400> 54

25 Lys Lys Lys Arg Lys
1 5

<210> 55
<211> 4
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> PÉPTIDO PORTADOR

35 <400> 55

Arg Arg Arg Arg
1

40 <210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> PÉPTIDO PORTADOR

<400> 56

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val His His His His His
1 5 10

50 <210> 57
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

55 <220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO siMYCN (795)

- <400> 57
uuccucuca ucaucuca 19
- 5 <210> 58
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO siMYCN (799)
- <400> 58
caucuuccuc uucaucauc 19
- 15 <210> 59
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO siMYCN (801)
- <400> 59
uucaucuucc ucuucauca 19
- 25 <210> 60
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO CON SENTIDO siMYCN (808)
- <400> 60
cuuccucuuc aucuuccuc 19
- 35 <210> 61
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial
- 40 <220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO siMYCN (810)
- 45 <400> 61
uucuuccucu ucaucuucc 19
- <210> 62
<211> 21
50 <212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO siARN-2'-OMe-ARN 808
- 55 <400> 62
cuuccucuuc aucuuccuct t 21
- <210> 63
60 <211> 21
<212> ARN
<213> Artificial
- <220>
65 <223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO siARN-2'F-ARN 808

<400> 63
 guuccucuuc aucuuccucu u 21

5 <210> 64
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO siARN-LNA 808

<400> 64
 cuuccucuuc aucuuccuct t 21

15 <210> 65
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO siARN-ANA 808

<400> 65
 guuccucuuc aucuuccuca a 21

25 <210> 66
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> PNA ANTI MYCN

<400> 66
 35 tcgggagcag tgggca 16

<210> 67
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

<220>
 <223> PNA ANTI MYCN

45 <400> 67
 gcgggtcgcg ggcacg 16

<210> 68
 <211> 16
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> PNA ANTI MYCN

55 <400> 68
 tggaggtcgg cgccgg 16

<210> 69
 <211> 16
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 65 <223> PNA ANTI MYCN

<400> 69
tcggcgggag gtaagg 16

5 <210> 70
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> PNA ANTI MYC

<400> 70
ctcagaggct tggcgg 16

15 <210> 71
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> PNA ANTI MYC

<400> 71
gcgccggct aggtg 16

25 <210> 72
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> PNA ANTI MYC

<400> 72
cggccggcta ggtgg 16

35 <210> 73
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> PNA ANTI MYC

45 <400> 73
cgacggcggg ggcggg 16

<210> 74
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> PNA ANTI MYC

55 <400> 74
ggacgggggc ggtgga 16

60 <210> 75
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

65 <220>
<223> PNA ANTI BIRC5

<400> 75
 gcggcggcat ggggtc 16

 5 <210> 76
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> PNA ANTI BIRC5

 <400> 76
 ggcggcggca tgggtg 16

 15 <210> 77
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> PNA ANTI ALK

 <400> 77
 gcaggagagg acggta 16
 25
 <210> 78
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> PNA ANTI ALK

 <400> 78
 35 caggagagga cggtac 16

 <210> 79
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI ALK

 45 <400> 79
 ggcaggagag gacggt 16

 <210> 80
 <211> 16
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> PNA ANTI BCL2
 55
 <400> 80
 ggatggcgca cgctgg 16

 <210> 81
 60 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 65 <223> PNA ANTI BCL2

ES 2 651 147 T3

<400> 81
gggaaggatg gcgcac 16

5 <210> 82
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> PNA ANTI BCL2

<400> 82
ccacggtggt ggagga 16

15 <210> 83
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> PNA ANTI PLK4

<400> 83
acggcaagcg gcggga 16

25 <210> 84
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> PNA ANTI PLK4

<400> 84
ggacggcaag cggcgg 16

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido antigénico de hebra sencilla complementario a la hebra de ADN antisentido de un gen objetivo, que comprende 6-30 nucleótidos, preferiblemente 12-24 nucleótidos, se caracteriza por una secuencia que comprende por lo menos tres grupos de por lo menos dos guaninas consecutivas.
- 10 2. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los grupos de por lo menos dos guaninas consecutivas son continuas entre sí o se separan mediante por lo menos uno nucleótido, dicho nucleótido no es una guanina.
3. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los grupos de por lo menos dos guaninas consecutivas son por lo menos cuatro, cinco o seis en número.
- 15 4. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho oligonucleótido se conjuga con una secuencia portadora en el extremo 3' y/o 5' de dicho oligonucleótido, preferiblemente un portador seleccionado del grupo que consiste de: la SEQ ID NO: 47-56.
- 20 5. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho oligonucleótido es por lo menos una molécula de ácido nucleico natural, preferiblemente ADN o ARN, ácido nucleico sintético o posible y químicamente modificado, preferiblemente PNA, LNA o morfolino, posible y químicamente modificado, o una combinación de dicho ácido nucleico natural y dicho ácido nucleico sintético.
- 25 6. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que 1) dicho por lo menos una molécula de ADN comprende por lo menos un nucleótido de LNA, metilfosfonato-LNA, BNA, RNG, DNG, GNA, UNA, ENA, ANA, F-ANA, PNA, G-PNA o morfolino; o comprende un nucleótido de ARN 2'O-Metilo, 2'O-Metoxietilo o 2'-fluoro; o 2) dicha por lo menos una molécula de ARN comprende por lo menos un nucleótido de ARN seleccionado de entre: un nucleótido de 2'O-Metilo, un nucleótido de 2'O-Metoxietilo, un nucleótido de 2'-fluoro; o por lo menos un nucleótido de un ácido nucleico seleccionado de entre: LNA, Metilfosfonato LNA, BNA, RNG, DNG, GNA, UNA, ENA, ANA, F-ANA, PNA, G-PNA o morfolino.
- 30 7. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha por lo menos una molécula de ADN o dicha por lo menos una molécula de ARN comprende por lo menos un nucleótido modificado al nivel del enlace fosfodiéster como un enlace fosforotioato.
- 35 8. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho PNA tiene una estructura estructural modificada en la que el carbono alfa tiene la cadena lateral de arginina o lisina como un sustituyente.
- 40 9. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho oligonucleótido se dirige contra por lo menos un gen responsable de una enfermedad de origen genético o viral o contra por lo menos un gen de tumor, en el que dicho gen se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de: por lo menos un gen que pertenece a la familia MYC, preferiblemente MYC, MYCN o MYCL1, BIRC5, BCL2, PLK4, ALK, PKM2, CASP8 y RASSF1.
- 45 10. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho oligonucleótido se selecciona de entre: SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 46, y SEQ ID NO: 68-84.
- 50 11. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 68 y 69 se dirigen contra el gen MYCN.
12. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la SEQ ID NO: 70-74 se dirigen contra el gen MYC; en el que la SEQ ID NO: 75, 76 se dirigen contra el gen BIRC5; en el que la SEQ ID NO: 77-79 se dirigen contra el gen ALK; en el que la SEQ ID NO: 80-82 se dirigen contra el gen BCL2; en el que la SEQ ID NO: 83, 84 se dirigen contra el gen PLK4.
- 55 13. Una composición que comprende por lo menos un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y por lo menos un excipiente farmacológicamente aceptable.
- 60 14. La composición comprende por lo menos un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en combinación con un compuesto seleccionado con acción farmacológica, preferiblemente en el grupo que consiste de: NGF, somatostatina, ácido retinoico, actinomicina D, asparaginasa, bleomicina, bussulfan capecitabina, carboplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, cisplatino, citarabina, clorambucilo, dacarbazina, daunorrubicina, docetaxel, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de epirubicina, etopósido, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, clorhidrato de idarubicina, hidroxiourea, ifofosfamida, clorhidrato de irinotecan, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, procarbazona, raltitrexed, streptozocin, tegafur-uracilo, temozolomida, tioguanina, tiotepa, topotecan, vinblastina, sulfato de vincristina,
- 65

vindesina y vinorelbina; en la que dicha combinación es preferiblemente: SEQ ID: NO 5 y carboplatino, o etopósido o cisplatino o vincristina.

5 15. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15 para uso como un medicamento.

10 16. El oligonucleótido o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 15, para el tratamiento de un tumor en el que dicho tumor es un tumor de adulto o pediátrico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en:
15 neuroblastoma, retinoblastoma, meduloblastoma, ependimoma, feocromocitoma, carcinoma embrionario, tumor de células germinales, rhabdomyosarcoma alveolar, rhabdomyosarcoma embrionario, tumor de Wilms, sarcoma de células claras del riñón, sarcoma sinovial, hepatoblastoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, linfoma de Burkitt, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfocítica crónica B, leucemia de células T, linfomas, cáncer de pulmón de células pequeñas (microcitoma), adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células epidermoides, cáncer de pulmón primario típico y atípico, carcinoma de pulmón de células grandes, carcinoma de pulmón neuroendocrino de células grandes, glioblastoma, hepatocarcinoma, carcinoma de células basales, tumor de ovario, tumor de mama y cáncer de colon.