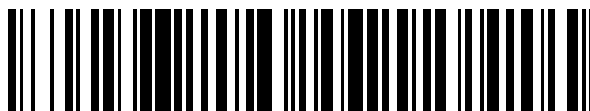


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 196**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2004 PCT/US2004/029718**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2017 WO05023994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2004 E 04783801 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 1667522**

54 Título: **Oligonucleótidos modificados para la inhibición de la telomerasa**

30 Prioridad:

09.09.2003 US 501509 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2018

73 Titular/es:

**GERON CORPORATION (100.0%)
149 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**GRYAZNOV, SERGEI y
PONGRACZ, KRISZTINA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 662 196 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 modificados para la inhibición de la telomerasa

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a compuestos útiles para la inhibición de la telomerasa. Más específicamente, la invención proporciona oligonucleótidos modificados que se dirigen al componente de ARN de la telomerasa y tienen características de captación celular potenciadas.

10

AntecedentesDesarrollo de oligonucleótidos para aplicaciones terapéuticas

15 Existe mucho interés en los usos médicos de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se están desarrollando tecnologías antisentido, de ribozimas, de aptámeros y de ARN de interferencia (ARNi) para posibles aplicaciones terapéuticas. El diseño de los ácidos nucleicos, en particular de oligonucleótidos, para la entrega *in vivo* requiere tener en cuenta diversos factores incluyendo la fuerza de unión, la especificidad de diana, la estabilidad en suero, la resistencia a las nucleasas y la captación celular. Se ha propuesto una serie de enfoques con el fin de producir oligonucleótidos que
20 tengan características adecuadas para su uso *in vivo*, tales como la química de cadena principal modificada, la formulación en vehículos de entrega y la conjugación con otros restos diversos. Serían particularmente beneficiosos oligonucleótidos terapéuticos con características adecuadas para la entrega sistémica.

25 Se revisan oligonucleótidos con cadenas principales modificadas químicas en Micklefield, *Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications*, *Curr. Med. Chem.*, 8 (10): 1157-1179, 2001 y Lyer et al., *Modified oligonucleotides--synthesis, properties and applications*, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 1 (3): 344-358, 1999.

Los ejemplos de químicas de cadena principal modificada incluyen:

- 30
- ácidos nucleicos peptídicos (ANP) (véase Nielsen, *Methods Mol. Biol.*, 208: 3-26, 2002),
 - ácidos nucleicos bloqueados (ANB) (véase Petersen y Wengel, *Trends Biotechnol.*, 21 (2): 74-81, 2003),
 - fosforotioatos (véase Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 10 (2): 117-21, 2000),
 - metilfosfonatos (véase Thivyanathan et al., *Biochemistry*, 41 (3): 827-38, 2002),
 - fosforamidatos (véase Gryaznov, *Biochem. Biophys. Acta*, 1489 (1): 131-40, 1999; Pruzan et al., *Nucleic Acids Res.*, 30 (2): 559-68, 2002), y
 - 35 • tiofosforamidatos (véase Gryaznov et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 20 (4-7): 401-10, 2001; Herbert et al., *Oncogene*, 21 (4): 638-42, 2002).

40 Cada uno de estos tipos de oligonucleótidos ha reportado ventajas y desventajas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos peptídicos (ANP) muestran buenas resistencia a nucleasas y fuerza de unión, pero tiene una captación celular reducida en cultivos de ensayo; los fosforotioatos muestran buenas resistencia a nucleasas y solubilidad, pero se sintetizan normalmente como mezclas quirales P y muestran varios efectos biológicos no específicos de secuencia; los metilfosfonatos muestran buenas resistencia a las nucleasas y captación celular, pero también se sintetizan normalmente como mezclas quirales P y han reducido la estabilidad del dúplex. Se notifica que los enlaces internucleósido fosforamidato N3' → P5' muestran propiedades de unión, resistencia a nucleasas y solubilidad favorables (Gryaznov y Letsinger, *Nucleic Acids Research*, 20: 3403-3409, 1992; Chen et al., *Nucleic Acids Research*, 23: 2661-2668, 1995; Gryaznov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 5798-5802, 1995; Skorski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 3966-3971, 1997). Sin embargo, también mostraron un aumento de la labilidad al ácido relativa a los homólogos fosfodiéster naturales (Gryaznov et al., *Nucleic Acids Research*, 24: 1508-1514, 1996). La
45 estabilidad al ácido de un oligonucleótido es una cualidad importante dado el deseo de usar agentes de oligonucleótidos como agentes terapéuticos por vía oral. La adición de un átomo de azufre a la cadena principal en oligonucleótidos de tiofosforamidato N3' → P5' proporciona una estabilidad al ácido potenciada.

50 Como con muchos otros compuestos terapéuticos, la naturaleza polianiónica de los oligonucleótidos reduce la capacidad del compuesto para atravesar las membranas lipídicas, lo que limita la eficiencia de la captación celular. Se han propuesto diversas soluciones para aumentar la captación celular de agentes terapéuticos, incluyendo la formulación en liposomas (para revisiones, véase Pedroso de Lima et al., *Curr Med Chem*, 10 (14): 1221-1231, 2003 y Miller, *Curr Med Chem.*, 10 (14): 1195-211, 2003) y la conjugación con un resto lipófilo. Los ejemplos de este último enfoque incluyen: la Patente de los EE.UU. N.º 5.411.947 (Método para convertir un fármaco en una forma disponible por vía oral mediante la unión covalente de un lípido al fármaco); la Patente de los EE.UU. N.º 6.448.392 (Derivados lipídicos de nucleósidos antivíricos: incorporación liposómica y método de uso); la Patente de los EE.UU. N.º 5.420.330 (Lipo-fosforamidatos); la Patente de los EE.UU. N.º 5.763.208 (Oligonucleótidos y sus análogos capaces de penetración pasiva de membrana de la celular); Gryaznov y Lloyd, *Nucleic Acids Research*, 21: 5909-5915, 1993 (Oligonucleótidos conjugados con colesterol); la Patente de los EE.UU. N.º 5,416,203 (Oligonucleótidos modificados con esteroides); el documento WO 90/10448 (Conjugados covalentes de lípido y oligonucleótido);
65

Gerster et al., *Analytical Biochemistry*, 262: 177-184 (1998) (Análisis cuantitativo de los oligonucleótidos antisentido modificados en fluidos biológicos usando nanopartículas catiónicas para la extracción en fase sólida); Bennett et al., *Mol. Pharmacol.*, 41: 1023-1033 (1992) (Los lípidos catiónicos potencian la captación celular y la actividad de oligonucleótidos antisentido de fosforotioato); Manoharan et al., *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.*, 12: 103-128 (2002) (Conjugados de oligonucleótidos como fármacos antisentido posibles con captación, biodistribución, entrega dirigida y mecanismo de acción mejorados); y Fiedler et al., *Langenbeck's Arch. Surg.*, 383: 269-275 (1998) (Inhibición del crecimiento de células tumorales pancreáticas por oligodesoxinucleótidos antisentido modificados).

La telomerasa como diana terapéutica

La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de secuencias de repetición teloméricas a los extremos de los cromosomas. Véase Blackburn, 1992, *Ann. Rev. Biochem.*, 61: 113-129. Existe un extenso cuerpo de bibliografía que describe la relación entre los telómeros, la telomerasa, la senescencia celular y el cáncer (para una revisión general, véase *Oncogene*, volumen 21, enero de 2002, que es un número completo de la revista centrado en la telomerasa). Por tanto, se ha identificado a la telomerasa como una diana excelente para agentes terapéuticos antineoplásicos (véase Lichsteiner et al., *Annals New York Acad. Sci.*, 886: 1-11, 1999).

Se han clonado y secuenciado genes que codifican tanto los componentes de proteína como de ARN de la telomerasa humana (véanse las Patentes de los EE.UU. N.º 6.261.836 y 5.583.016, respectivamente) y se ha invertido mucho esfuerzo en la búsqueda de inhibidores de la telomerasa. Los inhibidores de telomerasa identificados hasta la fecha incluyen compuestos de moléculas pequeñas y oligonucleótidos. Diversas publicaciones describen el uso de oligonucleótidos para inhibir la telomerasa, ya sea dirigidos contra el ARNm que codifica el componente de proteína de la telomerasa (cuya forma humana se conoce como transcriptasa inversa de la telomerasa humana o hTERT) o el componente de ARN de la holoenzima de telomerasa (cuya forma humana se conoce como ARN de telomerasa humana o hTR). En general, se cree que los oligonucleótidos que se dirigen al ARNm de hTERT actúan como fármacos antisentido convencionales en que se unen al ARNm, dando como resultado la destrucción del ARNm y, por tanto, evitando la producción de la proteína hTERT (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.444.650). Ciertos oligonucleótidos que se dirigen a hTR se diseñan para unirse a moléculas de hTR presentes dentro de la holoenzima de telomerasa y, por tanto, alteran la función de la enzima (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.548.298). Los ejemplos de publicaciones que describen diversos oligonucleótidos diseñados para reducir o eliminar la actividad telomerasa incluyen:

Patente de los EE.UU. N.º 6.444.650 (Composiciones antisentido para la detección y la inhibición de la transcriptasa inversa de la telomerasa);

Patente de los EE.UU. N.º 6.331.399 (Inhibición antisentido de la expresión de tert);

Patente de los EE.UU. N.º 6.548.298 (Telomerasa de mamífero);

Van Janta-Lipinski et al., *Nucleosides Nucleotides*, 18 (6-7): 1719-20, 1999 (Proteína y ARN de la telomerasa humana como dianas para oligonucleótidos modificados);

Gryaznov et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 20: 401-410, 2001 (Fosforamidatos de oligonucleótidos inhibidores de telomerasa como posibles agentes terapéuticos);

Herbert et al., *Oncogene*, 21 (4): 638-42, 2002 (Fosforamidatos N3' → P5' de oligonucleótidos como inhibidores de la telomerasa eficientes);

Pruzan et al., *Nucleic Acids Research*, 30 (2): 559-568, 2002 (Inhibidores alostéricos de la telomerasa: fosforamidatos N3' → P5' de oligonucleótidos);

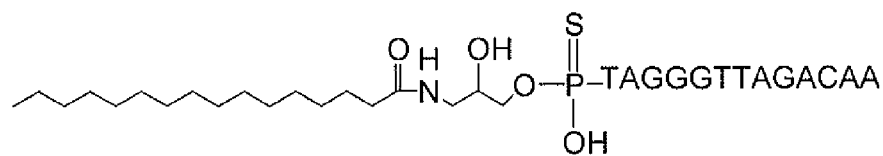
Publicación PCT WO 01/18015 (Tiofosforamidatos N3'-P5' de oligonucleótidos: su síntesis y uso); y

Asai et al., *Cancer Research*, 63: 3931-3939, 2003 (Un antagonista novedoso del molde de la telomerasa (GRN163) como posible agente antineoplásico).

El documento US 6.608.036 B1 (Gryaznov et al.; 19 de agosto de 2003) describe ciertos oligonucleótidos con una cadena principal de azúcar-fosfato que contiene al menos un enlace internucleosídico 3'-NHP(O)(S')O-5', así como métodos de fabricación y uso de estos oligonucleótidos.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención es un compuesto que tiene la estructura:

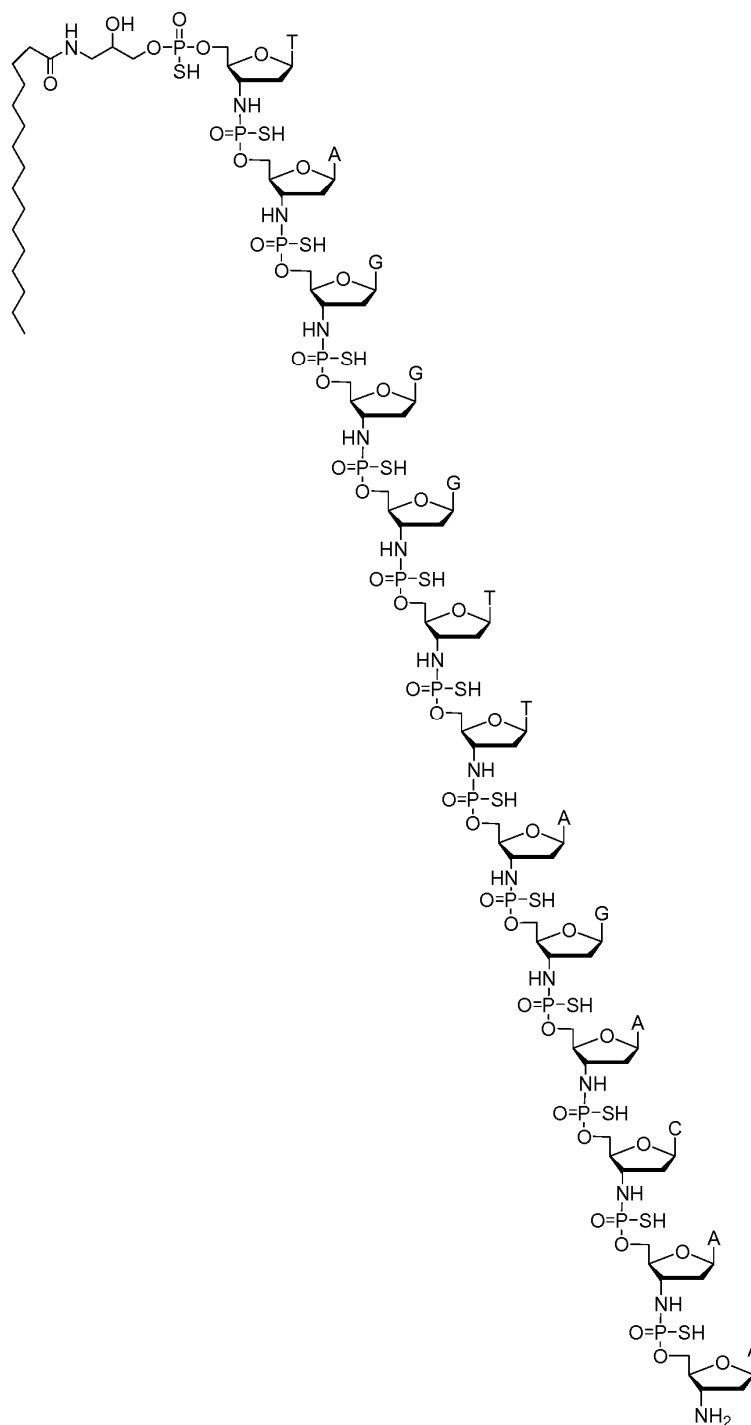


en la que los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido comprenden al menos un enlace tiofosforamidato N3' → P5'; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

En una realización, los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido son enlaces tiofosforamidato N3' → P5'.

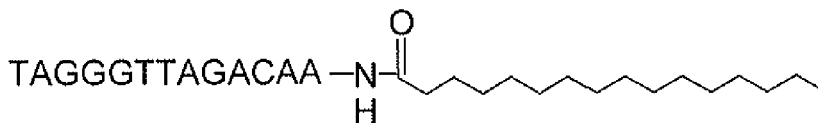
En una realización, el compuesto es:



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un segundo aspecto de la invención es un compuesto que tiene la estructura:



en la que los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido comprenden al menos un enlace tiofosforamidato N3' → P5'; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En una realización, los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido son enlaces tiofosforamidato N3' → P5'.

En una realización, la sal es una sal de sodio.

En una realización, el compuesto es una sal de sodio.

15 Un tercer aspecto de la invención es un método *in vitro* de inhibición de la actividad de una enzima telomerasa, comprendiendo el método poner en contacto la enzima telomerasa con un compuesto del primer o segundo aspecto.

Un cuarto aspecto de la invención es un método *in vitro* de inhibición de la actividad de la enzima telomerasa en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un compuesto del primer o segundo aspecto.

En una realización, la célula es una célula cancerosa.

Un quinto aspecto de la invención es un método *in vitro* de inhibición de la proliferación de una célula cancerosa, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un compuesto del primer o segundo aspecto.

Un sexto aspecto de la invención es un compuesto del primer o segundo aspecto para su uso en medicina.

30 Un séptimo aspecto de la invención es un compuesto del primer o segundo aspecto para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, el cáncer es un tumor hemático.

35 Un octavo aspecto de la invención es el uso de un compuesto del primer o segundo aspecto en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

En una realización, el cáncer es un tumor hemático.

Un noveno aspecto de la invención es el uso de un compuesto del primer o segundo aspecto en la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de una célula cancerosa.

Un décimo aspecto de la invención es el uso de un compuesto del primer o segundo aspecto en la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad de una enzima telomerasa.

45 Un undécimo aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto del primer o segundo aspecto.

Un duodécimo aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto del primer o segundo aspecto formulado en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 En una realización, la composición farmacéutica comprende adicionalmente otro agente quimioterápico.

Un decimotercer aspecto de la invención es una composición farmacéutica del undécimo o duodécimo aspecto para su uso en medicina.

55 Un decimocuarto aspecto de la invención es una composición farmacéutica del undécimo o duodécimo aspecto para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, el cáncer es un tumor hemático.

60 Un decimoquinto aspecto de la invención es un compuesto del primer o segundo aspecto para su uso en medicina junto con radioterapia.

Un decimosexto aspecto de la invención es un compuesto del primer o segundo aspecto para su uso en medicina junto con otro agente quimioterápico.

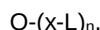
Un decimoséptimo aspecto de la invención es el uso de un compuesto del primer o segundo aspecto en combinación con otro agente quimioterápico en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

En una realización, el cáncer es un tumor hemático.

Descripción

Las composiciones y métodos que se describen en el presente documento se refieren a compuestos inhibidores de la telomerasa que comprenden un oligonucleótido y al menos un grupo lipídico unido covalentemente. Los compuestos que se describen en el presente documento tienen propiedades de captación celular superiores en comparación con los oligonucleótidos no modificados. Esto significa que puede obtenerse un efecto biológico equivalente usando cantidades más pequeñas del oligonucleótido conjugado en comparación con la forma no modificada. Cuando se aplica al escenario de la terapéutica humana, esto puede traducirse en una reducción de los riesgos de toxicidad y en el ahorro de costes. Los compuestos que se describen en el presente documento inhiben la telomerasa en las células, incluyendo las células cancerosas, cuyo efecto resultante es inhibir la proliferación de las células. En consecuencia, una aplicación principal de los compuestos que se describen en el presente documento es como terapéutica contra el cáncer y las formulaciones farmacéuticas de los compuestos puede utilizarse de esta manera.

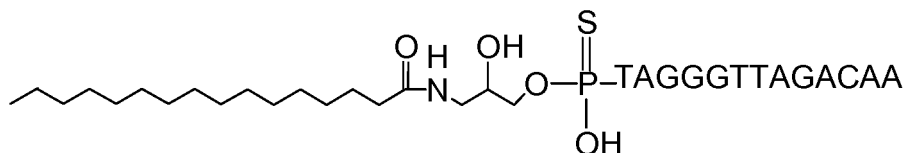
Los compuestos que se describen en el presente documento pueden representarse por la fórmula:



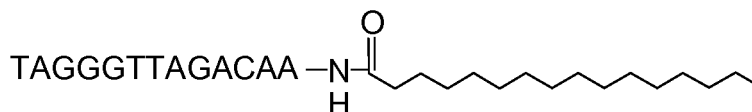
en la que O representa el oligonucleótido, x es un grupo enlazador opcional, L representa el resto lipídico y n es un número entero de 1 a 5. Normalmente, $n = 1$ o 2 , pero cuando $n > 1$, cada resto lipídico L se selecciona independientemente. El resto lipídico normalmente está unido covalentemente al oligonucleótido en uno (o si $n = 2$, cada uno) de los extremos 3' y 5', pero también puede estar unido a otros sitios, incluyendo una o más bases.

El grupo lipídico L es normalmente un hidrocarburo alifático o ácido graso, incluyendo derivados de hidrocarburos y ácidos grasos, siendo ejemplos compuestos de cadena lineal saturada que tienen 14 - 20 átomos de carbono, tales como el ácido mirístico (C14, también conocido como ácido tetradecanoico), el ácido palmítico (C16, también conocido como ácido hexadecanoico) y el ácido esteárico (C18, también conocido como ácido octadecanoico) y sus correspondientes formas de hidrocarburo alifático, tetradecano, hexadecano y octadecano, junto con derivados tales como derivados de amina y amida. Son ejemplos de otros grupos de lípidos adecuados que pueden emplearse esteroides, tales como colesterol y ácidos grasos e hidrocarburos sustituidos, en particular, formas polifluoradas de estos grupos. El componente oligonucleotídico O puede ser un ácido ribo o desoxirribonucleico o formas modificadas de los mismos y los enlaces que conectan las nucleobases pueden estar hechos con cualquier química compatible, incluyendo: enlaces fosfodiéster; fosfotriéster; metilfosfonato; fosforamidato $P3' \rightarrow N5'$; fosforamidato $N3' \rightarrow P5'$; tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$; y fosforotioato. Se prefieren las químicas de fosforamidato $N3' \rightarrow P5'$ y tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$. La secuencia del componente oligonucleotídico O incluye al menos una región de secuencia que es complementaria, preferentemente exactamente complementaria, a una región "diana" seleccionada de la secuencia del componente de ARN de telomerasa. En realizaciones particulares, la secuencia del componente oligonucleotídico O contiene una región de secuencia que es complementaria a la secuencia dentro de una de las siguientes regiones del componente de ARN de la telomerasa humana, hTR (cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO: 1): 46 - 56, 137 - 196, 290 - 319 y 350 - 380. La longitud de la secuencia dentro del componente O que es exactamente complementaria a una región de hTR es preferentemente de al menos 5 bases, más preferentemente de al menos 8 bases y aún más preferentemente de al menos 10 bases. Pueden añadirse regiones de secuencia adicionales al componente O que no sean exactamente complementarios a hTR, pero que puedan proporcionar una función beneficiosa adicional.

Los compuestos de ejemplo que se describen en el presente documento incluyen los representados en las estructuras a continuación en las que el componente O tiene enlaces tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$ entre nucleósidos y es exactamente complementario a las bases 42 - 54 de hTR (SEQ ID NO: 1). En la primera estructura de ejemplo, L, el resto lipídico es palmitoil amida (derivada de ácido palmítico), conjugada a través de un enlazador de aminoglicerol con el grupo tiofosfato 5' del oligonucleótido O:



En la segunda estructura de ejemplo, L se conjuga a través del grupo 3'-amino del oligonucleótido con la palmitoil amida:



Se demuestra que compuestos que se describen en el presente documento, incluyendo estos compuestos de ejemplo, tienen propiedades de captación celular superiores, en comparación con los oligonucleótidos no modificados correspondientes y, por tanto, son inhibidores más eficaces de la actividad telomerasa celular. Como consecuencia de estas propiedades, los compuestos que se describen en el presente documento son inhibidores altamente eficaces de la proliferación de células cancerosas.

Los compuestos que se describen en el presente documento pueden usarse en métodos para inhibir la actividad enzimática de la telomerasa. Dichos métodos comprenden poner en contacto una enzima telomerasa con un compuesto como se describe en el presente documento. Los compuestos que se describen en el presente documento también pueden usarse para inhibir la telomerasa en células que expresan telomerasa, inhibiendo de este modo la proliferación de dichas células. Dichos métodos comprenden poner en contacto una célula o células que tienen actividad telomerasa con un compuesto como se describe en el presente documento. Las células tratadas de esta manera, que pueden ser células in vitro o células in vivo, generalmente, experimentarán un acortamiento de los telómeros y dejarán de proliferar. Puesto que las células cancerosas requieren la actividad telomerasa para la proliferación a largo plazo, los compuestos que se describen en el presente documento son particularmente útiles para inhibir el crecimiento de células cancerosas y pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas para tratar el cáncer.

En el presente documento también se describen los compuestos como se describen en el presente documento para su uso en medicina y, en particular, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En el presente documento también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de oligonucleótido como se describe en el presente documento formulado con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra ejemplos de la unión de diversos grupos L lipídicos a oligonucleótidos en compuestos que se describen en el presente documento.

La **Figura 2** muestra esquemas de procedimientos de síntesis de ejemplo para los compuestos que se describen en el presente documento. Las Figuras 2A, 2B y 2C muestran procedimientos de síntesis que pueden usarse para la producción de compuestos en los que el resto lipídico se conjuga con el extremo 3' del oligonucleótido. El esquema que se muestra en la Figura 2C es una aminación reductora que comienza con un aldehído lipídico; esto produce un enlace amina entre el grupo lipídico y el oligonucleótido (véase el Esquema B a continuación), a diferencia del esquema mostrado en la Figura 2A, donde los materiales de partida son formas de ácido carboxílico, anhídrido de ácido o cloruro de ácido de un ácido graso, dando como resultado la formación de un enlace amida (véase el Esquema A a continuación). La Figura 2B muestra un esquema adecuado para producir un enlace tiofosforamidato 3'. En este ejemplo, se muestra una secuencia de enlazador de amino glicerol (O-CH₂CH₂CH₂-NHC(O)), pero se apreciará que esta síntesis puede emplearse sin un enlazador de este tipo o con secuencias de unión alternativas. La Figura 2D muestra un procedimiento de síntesis que puede usarse para la producción de compuestos en los que el resto lipídico se conjuga con el extremo 5' del oligonucleótido a través de un grupo fosfato (o tiofosfato cuando X = S). En estos esquemas, el extremo 3' del oligonucleótido se muestra como un grupo amino, en consonancia con los enlaces oligonucleotídicos preferidos de las químicas de tiofosforamidato (X = S) y fosforamidato (X = O). La Figura 2E muestra una base protegida de ejemplo modificada con un grupo lipídico (en el presente documento, guanósina modificada por conjugación con tetradecilo), que puede usarse en procedimientos de síntesis de oligonucleótidos convencionales para preparar un oligonucleótido en el que uno o más grupos lipídicos se unen covalentemente a una o más bases nitrogenadas. En la Figura 2, se aplican las siguientes abreviaturas:

i = Cl-C(O)-R''/(i-Pr)₂NEt o HO-C(O)-R'' / C.A o [C(O)-R'']₂O/(i-Pr)₂NEt

ii = DMTO-CH₂CHO(CEO-P[N(i-Pr)₂])-CH₂-NHC(O)-R''/Tetr

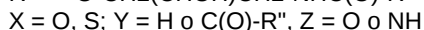
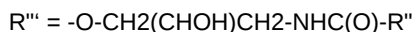
iii = elongación de la cadena oligonucleotídicas

iv = R''- HC = O + [H]

R = Oligonucleótido protegido con P,N soportado con 5'-CPG

R' = NP- o NPS – Oligonucleótido desprotegido

R'' = resto lipídico, L (con el que puede conjugarse un enlazador, si se desea, véase R''' para un ejemplo de un enlazador de amino glicerol conjugado)



Las **Figuras 3 y 4** son gráficos que muestran la capacidad de los compuestos que se describen en el presente documento para inhibir la actividad telomerasa en células U251 y DU145, respectivamente (véase el Ejemplo 3 para una descripción completa). En estas y las siguientes figuras, A, B y C son compuestos como se describen en el Ejemplo 3 y se muestran en la Figura 9.

La **Figura 5** es una imagen de un gel que muestra resultados de ensayos TRAP realizados en células tumorales humanas disecadas de modelo de ratones con xenoinjertos tumorales humanos después del tratamiento con o sin compuestos que se describen en el presente documento (véase el Ejemplo 4 para una descripción completa).

La **Figura 6** es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos de proteína de mieloma en ratones que albergaban xenoinjertos de mieloma humano, después del tratamiento con o sin compuestos que se describen en el presente documento (véase el Ejemplo 5 para una descripción completa).

Las **Figuras 7 y 8** son gráficos que representan el efecto sobre el volumen del tumor, la actividad telomerasa y las longitudes de los telómeros, en ratones que albergaban xenoinjertos de mieloma humano, con o sin la administración de compuestos que se describen en el presente documento (véase el Ejemplo 6 para una descripción completa).

La **Figura 9** representa las estructuras de los compuestos A, B y C utilizados en los Ejemplos 3 - 7 en los que el componente oligonucleotídico tiene enlaces tiofosforamidato.

Listado de secuencias

La SEQ ID NO: 1 del Listado de Secuencias adjunto proporciona la secuencia del componente de ARN de la telomerasa humana (hTR) (véase también Feng et al., *Science* 269 (5228): 1236-1241, 1995 y GenBank, N.º de Acceso U86046). Se hace referencia en toda la presente divulgación a diversos oligonucleótidos, cuyas secuencias son complementarias a regiones contenidas dentro de la SEQ ID NO: 1, por referencia a la ubicación de la secuencia dentro de la SEQ ID NO: 1 con respecto a la cual son complementarios.

Descripción detallada

A. Definiciones

Un "grupo alquilo" se refiere a un grupo alquilo o alquilo sustituido que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, tal como metilo, etilo y propilo. Alquilo inferior se refiere normalmente a C₁ a C₅. Alquilo intermedio se refiere normalmente a C₆ a C₁₀. Un "grupo acilo" se refiere a un grupo que tiene la estructura RCO en la que R es un alquilo. Un acilo inferior es un acilo en el que R es un alquilo inferior.

Un grupo "alquilamina" se refiere a un grupo alquilo con un nitrógeno unido, por ejemplo, 1-metil-1-butilamina (CH₃CHNH₂CH₂CH₂CH₃).

Un "grupo arilo" se refiere a un grupo de anillo aromático que tiene 5 - 20 átomos de carbono, tal como fenilo, naftilo, antrilo o grupos arilo sustituidos, tales como, sustituciones con alquilo o arilo como toloilo, etilfenilo, bifenililo, etc. También se incluyen grupos de anillos aromáticos heterocíclicos que tienen uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo.

"Oligonucleótido" se refiere a polímeros de subunidades de nucleósidos de ribosa y/o desoxirribosa que tienen entre aproximadamente 2 y aproximadamente 200 subunidades contiguas. Las subunidades de nucleósido pueden estar unidas por diversos enlaces entre subunidades, incluyendo enlaces fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, fosforamidato P3' → N5', fosforamidato N3' → P5', tiofosforamidato N3' → P5' y fosforotioato. Adicionalmente, "oligonucleótidos" incluye modificaciones, conocidas para un experto en la materia, del azúcar (por ejemplo, sustituciones en 2'), de la base (véase la definición de "nucleósido" a continuación) y de los extremos 3' y 5'. En realizaciones en las que el resto oligonucleotídico incluye una pluralidad de enlaces entre subunidades, cada enlace puede formarse usando la misma química o una mezcla de químicas de enlace. El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, tiene el mismo significado que "oligonucleótido" y se usa de forma intercambiable con "oligonucleótido".

Siempre que un oligonucleótido se representa mediante una secuencia de letras, tal como "ATGUCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5' → 3' de izquierda a derecha. La representación de la secuencia de bases del oligonucleótido de esta manera no implica el uso de ningún tipo particular de subunidad internucleosídica en el oligonucleótido.

Como se usa en el presente documento, "nucleósido" incluye los nucleósidos naturales, incluyendo las formas 2'-

desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Komberg y Baker, *DNA Replication*, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) y análogos. "Análogos", en referencia a nucleósidos incluye nucleósidos sintéticos que tienen restos de nucleobases modificadas (véase la definición de "nucleobase" a continuación) y/o restos de azúcar modificados, por ejemplo, descritos en general por Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, Nueva York, 1980).

Dichos análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para potenciar las propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad y la especificidad, tales como los desvelados por Uhlmann y Peyman (*Chemical Reviews*, 90: 543-584, 1990).

El término "lípidos" se usa ampliamente en el presente documento para abarcar sustancias que son solubles en disolventes orgánicos, pero escasamente solubles, si es que los son, en agua. El término lípidos incluye hidrocarburos, aceites, grasas (tales como ácidos grasos, glicéridos), esteroides, esteroides y formas derivadas de estos compuestos. Son lípidos preferidos ácidos grasos y sus derivados, hidrocarburos y sus derivados y esteroides, tales como colesterol. Como se usa en el presente documento, el término lípidos incluye también compuestos anfipáticos que contienen restos tanto lipídicos como hidrófilos.

Los ácidos grasos contienen, por lo general, un número par de átomos de carbono en una cadena lineal (habitualmente 12 - 24 carbonos) y pueden ser saturados o insaturados, y pueden contener, o pueden modificarse para contener, diversos grupos sustituyentes. Por simplicidad, la expresión "ácido graso" también abarca derivados de ácidos grasos, tales como las amidas grasas producidas mediante el esquema de síntesis que se muestra en la Figura 2A (véanse, por ejemplo, los compuestos que se muestran en las Figuras 1A - 1E).

El término "hidrocarburo" como se usa en el presente documento abarca compuestos que consisten solamente en hidrógeno y carbono, unidos por enlaces covalentes. El término abarca hidrocarburos de cadena abierta (alifáticos), incluyendo hidrocarburos de cadena lineal y ramificados, e hidrocarburos saturados, así como mono y poliinsaturados. El término también abarca hidrocarburos que contienen uno o más anillos aromáticos.

El término "sustituido" se refiere a un compuesto que se ha modificado mediante el intercambio de un átomo por otro. En particular, el término se utiliza en referencia a hidrocarburos halogenados y ácidos grasos, en particular aquellos en los que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos con flúor.

Una "nucleobase" como se usa en el presente documento incluye (i) nucleobases de ADN y ARN típicas (uracilo, timina, adenina, guanina y citosina), (ii) nucleobases modificadas o análogos de nucleobases (por ejemplo, 5-metilcitosina, 5-bromouracilo o inosina) y (iii) análogos de nucleobases. Un análogo de nucleobase es una sustancia química cuya estructura molecular imita la de una base de ADN o ARN típica.

Como se usa en el presente documento, "pirimidina" significa las pirimidinas que aparecen en nucleósidos naturales, incluyendo citosina, timina y uracilo y análogos de los mismos, tales como los que contienen oxi, metilo, propinilo, metoxi, hidroxilo, amino, tio, halo y sustituyentes. El término como se usa en el presente documento incluye, adicionalmente, pirimidinas con grupos de protección unidos, tales como N₄-benzoilcitosina. Se desvelan otros grupos de protección de pirimidina por Beaucage y Iyer (*Tetrahedron* 48: 223-2311, 1992).

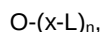
Como se usa en el presente documento, "purina" se refiere a las purinas que aparecen en nucleósidos naturales, incluyendo adenina, guanina e hipoxantina y análogos de las mismas, tales como los que contienen oxi, metilo, propinilo, metoxi, hidroxilo, amino, tio, halo y sustituyentes. El término como se usa en el presente documento incluye, además, purinas con grupos de protección unidos, tales como N₂-benzoilguanina, N₂-isobutirilguanina y N₆-benzoiladenina. Se desvelan otros grupos de protección de purina por Beaucage y Iyer (citados anteriormente).

Como se usa en el presente documento, el término "protegido" como un componente de un nombre químico se refiere a grupos de protección reconocidos en la técnica para un resto particular de un compuesto, por ejemplo, "hidroxilo protegido en 5'", en referencia a un nucleósido incluye trifenilmetilo (es decir, tritilo), p-anisildifenilmetilo (es decir, monometoxitritilo o MMT) y di-p-anisilfenilmetilo (es decir, dimetoxitritilo o DMT). Los grupos de protección reconocidos en la técnica incluyen los que se describen en las siguientes referencias: Gait, editor, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath y Broom, *Chemical Reviews*, 77: 183-217, 1977; Pon et al., *Biotechniques*, 6: 768-775, 1988; Ohtsuka et al., *Nucleic Acids Research*, 10: 6553-6570, 1982; Eckstein, editor, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, segunda edición, (John Wiley & Sons, Nueva York, 1991); Narang, editor, *Synthesis and Applications of DNA and RNA* (Academic Press, Nueva York, 1987); Beaucage y Iyer (citados anteriormente) y referencias similares.

El término "halógeno" o "halo" se usa en su sentido convencional para referirse a un sustituyente cloro, bromo, flúor o yodo. En los compuestos que se describen y se reivindican en el presente documento, los sustituyentes de halógeno son generalmente fluoro, bromo o cloro, preferentemente fluoro o cloro.

B. Diseño de los compuestos que se desvelan

Los compuestos que se describen en el presente documento pueden representarse por la fórmula:



en la que O representa el oligonucleótido, x es un grupo enlazador opcional, L representa el resto lipídico y n es un número entero de 1 a 5.

El diseño de los compuestos requiere, por tanto, la selección de dos entidades, O y L, y la determinación del enlace estructural o enlaces estructurales entre estas entidades, que pueden implicar el grupo enlazador opcional x.

Selección de O

El componente oligonucleotídico O puede considerarse el componente "efector" del compuesto porque es este componente el que efectúa la inhibición de la enzima telomerasa mediante la unión al componente de ARN de la telomerasa. Por tanto, la secuencia de O se selecciona de manera que incluya una región que sea complementaria a la secuencia del ARN de la telomerasa, que se muestra en la SEQ ID NO: 1. La región que es complementaria al componente de ARN de la telomerasa puede, en teoría, dirigirse a cualquier porción del ARN de la telomerasa, pero regiones particulares del ARN de la telomerasa son dianas preferidas para los oligonucleótidos inhibitorios. Una región diana preferida es la región que abarca los nucleótidos 30 - 67 de la SEQ ID NO: 1, que incluye la "región molde", una región de 11 nucleótidos de la secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' que abarca los nucleótidos 46 - 56 de la SEQ ID NO: 1. La región molde actúa especificando la secuencia de las repeticiones teloméricas que la telomerasa añade a los extremos de los cromosomas y es esencial para la actividad de la enzima telomerasa (véase Chen et al., *Cell* 100: 503-514, 2000; Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98 (14): 7982-7987, 2001). Por tanto, se prefieren en particular compuestos que se describen en el presente documento que contienen un resto de oligonucleótido que comprende una secuencia complementaria a toda o parte de la región molde. Otra región diana preferida es la región que abarca los nucleótidos 137 - 179 de hTR (véase Pruzan et al., *Nucl. Acids Research*, 30: 559-568, 2002). Dentro de esta región, la secuencia que abarca los nucleótidos 141 - 153 es una diana preferida. La Publicación PCT WO 98/28442 describe el uso de oligonucleótidos de al menos 7 nucleótidos de longitud para inhibir la telomerasa, en la que los oligonucleótidos se diseñan para que sean complementarios a porciones accesibles de la secuencia de hTR fuera de la región molde, incluyendo los nucleótidos 137 - 196, 290 - 319 y 350 - 380 de hTR.

La región de O que se dirige a la secuencia de hTR es preferentemente exactamente complementaria a la secuencia de hTR correspondiente. Aunque pueden tolerarse desapareamientos en ciertos casos, se espera que disminuyan la especificidad y la actividad del conjugado oligonucleotídico resultante. En realizaciones particulares, la secuencia de bases del oligonucleótido O se selecciona, por tanto, para que incluya una secuencia de al menos 5 nucleótidos exactamente complementarios al ARN de la telomerasa y puede obtenerse una inhibición de la telomerasa potenciada si se emplean longitudes cada vez mayores de la secuencia complementaria, tales como al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 13 o al menos 15 nucleótidos exactamente complementarios al ARN de la telomerasa. En otras realizaciones, la secuencia del oligonucleótido incluye una secuencia de al menos 5 a 20, de al menos 8 a 20, de al menos 10 a 20 o de al menos 10 a 15 nucleótidos exactamente complementarios a la secuencia de ARN de la telomerasa. La actividad inhibidora de la telomerasa óptima puede obtenerse cuando la longitud completa del oligonucleótido O se selecciona para que sea complementaria al ARN de la telomerasa. Sin embargo, no es necesario que la longitud completa del componente oligonucleotídico sea exactamente complementaria a la secuencia diana y la secuencia oligonucleotídica puede incluir regiones que no sean complementarias a la secuencia diana. Dichas regiones pueden añadirse, por ejemplo, para conferir otras propiedades al compuesto, tales como secuencias que facilitan la purificación. Si el componente oligonucleotídico O ha de incluir regiones que no sean complementarias a la secuencia diana, dichas regiones normalmente se sitúan en uno o ambos de los extremos 5' o 3'. En los casos en los que la región de complementariedad exacta se dirige a la región molde, puede conseguirse la inhibición eficaz de la telomerasa con una región corta (5 - 8 nucleótidos) de complementariedad exacta a la que se une una secuencia (rica en G) similar a la telomerasa en el extremo 5'.

Las secuencias de ejemplo que son complementarios al ARN de la telomerasa humana y que pueden incluirse como parte del componente oligonucleotídico O, o que pueden usarse como el componente oligonucleotídico O entero incluyen las siguientes:

Secuencia oligonucleotídica	Secuencia complementaria a hTR (región de la SEQ ID NO: 1)
GCTCTAGAAATGAACGGTGGAAGGCGGCAGG	137-166
GTGGAAGGCGGCAGG	137-151
GGAAGGCGGCAGG	137-149
GTGGAAGGCGGCA	139-151
GTGGAAGGCGG	141-151
CGGTGGAAGGCGG	141-153
ACGGTGAAGGCGG	142-154
AACGGTGAAGGCGGC	143-155

ATGAACGGTGGGAAGGCGG	144-158
ACAIIIIIIGIIIGCTCTAG	160-179
TAGGGTTAGACAA	42-54
GTTAGGGTTAG	46-56
GTTAGGGTTAGAC	44-56
GTTAGGGTTAGACAA	42-56
GGGTTAGAC	44-52
CAGTTAGGG	50-58
CCCTTCTCAGTT	54-65
CGCCCTTCTCAG	56-67

La elección del tipo de enlaces internucleosídicos utilizados en la síntesis del componente O puede estar hecho de cualquiera de las químicas de oligonucleótidos disponibles, incluyendo enlaces fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, fosforamidato $P3' \rightarrow N5'$, fosforamidato $N3' \rightarrow P5'$, tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$ y fosforotioato.

En realizaciones preferidas, el componente oligonucleotídico O tiene al menos un enlace fosforamidato $N3' \rightarrow P5'$ o tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$, enlace que puede representarse por la estructura:

$3'[-NH-P(=O)(-XR)-O]-5'$, en la que X es O o S y R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Normalmente, pero no necesariamente, todos los enlaces internucleosídicos dentro del oligonucleótido O serán del mismo tipo, aunque el componente oligonucleotídico puede sintetizarse usando una mezcla de diferentes enlaces. Cuando el resto lipídico ha de conjugarse con el extremo 3' del oligonucleótido, la síntesis del conjugado se ve facilitada en gran medida por un grupo 3'-amino en el oligonucleótido. Por tanto, incluso si una de las químicas preferidas no se selecciona, la adición de un grupo 3'-amino es ventajosa.

Selección de L

Los compuestos que se describen en el presente documento son más eficaces en la producción de inhibición de la telomerasa en las células que los oligonucleótidos correspondientes que no se conjugan con componentes lipídicos. Se cree que el componente lipídico L actúa potenciando la captación celular del compuesto, en particular facilitando el paso a través de la membrana celular. Aunque el mecanismo por el cual esto ocurre no se ha aclarado completamente, una posibilidad es que el componente lipídico puede facilitar la unión del compuesto a la membrana celular, ya sea como una sola molécula o en forma de un agregado (micelar), con la internalización posterior. Sin embargo, no se requiere la comprensión del mecanismo preciso para utilizar los compuestos y métodos que se describen en el presente documento.

El componente lipídico puede ser cualquier lípido o derivado de lípido que proporcione una captación celular potenciada en comparación con el oligonucleótido no modificado. Son lípidos preferidos los hidrocarburos, grasas (por ejemplo, glicéridos, ácidos grasos y derivados de ácidos grasos, tales como amidas grasas) y esteroides. Cuando el componente lipídico es un hidrocarburo, el componente L puede ser un hidrocarburo cíclico sustituido o sin sustituir o un hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada, que puede ser saturado o insaturado. Son ejemplos preferidos los hidrocarburos no ramificados de cadena lineal que están completamente saturados o son poliinsaturados. La longitud de la cadena de hidrocarburo puede variar de C_2 - C_{30} , pero la inhibición óptima de la telomerasa puede obtenerse con cadenas carbonadas que sea C_8 - C_{22} . Se enumeran a continuación ejemplos preferidos de hidrocarburos saturados (alcanos):

Nombre sistemático	Cadena carbonada
Tetradecano	$C_{14}H_{30}$
Pentadecano	$C_{15}H_{32}$
Hexadecano	$C_{16}H_{34}$
Heptadecano	$C_{17}H_{36}$
Octadecano	$C_{18}H_{38}$
Nonadecano	$C_{19}H_{40}$
Eicosano	$C_{20}H_{42}$

También pueden seleccionarse formas mono y poliinsaturadas (alquenos y polienos, tales como alcadienos y alcatrienos) de hidrocarburos, prefiriéndose los compuestos que tienen de uno a tres dobles enlaces, aunque pueden emplearse compuestos que tengan más dobles enlaces. También pueden utilizarse alquinos (que contienen uno o más triples enlaces) y alquenininos (triple enlace o enlaces y doble enlace o enlaces). Los ejemplos de hidrocarburos mono y poliinsaturados comunes que pueden emplearse incluyen los que se muestran en las Figuras 1M, 1L y 1O.

Pueden emplearse formas sustituidas de hidrocarburos en los compuestos que se describen en el presente documento, prefiriéndose grupos sustituyentes que sean inertes in vivo e in vitro. Un sustituyente particularmente preferido es el flúor. Las estructuras genéricas de ejemplo de hidrocarburos polifluorados incluyen:

- 5 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m-$ en la que m es al menos 1, preferentemente al menos 2 y n = 1 - 30, tal como fluorotridecano: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9(\text{CH}_2)_3-$; y $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c-$ donde a, b y c son independientemente 1 - 30.

10 La Figura 1W muestra un ejemplo de un hidrocarburo polifluorado conjugado con el extremo 5' de un oligonucleótido.

Otros componentes lipídicos adecuados incluyen ácidos grasos simples y derivados de ácidos grasos, glicéridos y lípidos más complejos, tales como los esteroides, por ejemplo, colesterol. Los ácidos grasos y sus derivados pueden estar completamente saturados o ser mono o poliinsaturados. La longitud de la cadena carbonada puede variar de C_2 - C_{30} , pero la inhibición óptima de la telomerasa puede obtenerse con cadenas carbonadas que sean C_8 - C_{22} . Se enumeran a continuación ejemplos preferidos de ácidos grasos saturados:

Nombre sistemático	Nombre trivial	Cadena carbonada
Tetradecanoico	mirístico	14:0
Hexadecanoico	palmítico	16:0
Esteárico	esteárico	18:0
Eicosánico	araquídico	20:0

20 También pueden emplearse formas mono y poliinsaturadas de ácidos grasos, prefiriéndose compuestos que tengan de uno a tres dobles enlaces, aunque también pueden emplearse compuestos que tengan más dobles enlaces. Los ejemplos de ácidos grasos mono y poliinsaturados comunes que pueden emplearse incluyen:

Nombre sistemático	Nombre trivial	Cadena carbonada
<i>Cis</i> -9-hexadecanoico	palmitoleico	16:1 (n-7)
<i>Cis</i> -6-octadecanoico	petroselínico	18:1 (n-12)
<i>Cis</i> -9-octadecanoico	oleico	18:1 (n-9)
9,12-octadecadienoico	linoleico	18:2 (n-6)
6,9,12-octadecatrienoico	<i>gamma</i> -linolénico	18:3 (n-6)
9,12,15-octadecatrienoico	<i>alfa</i> -linolénico	18:3 (n-3)
5,8,11,14-eicosatetraenoico	araquidónico	20:4 (n-6)

25 También pueden emplearse ácidos grasos con uno o más triples enlaces en la cadena carbonada, así como ácidos grasos ramificados en los compuestos que se describen en el presente documento. Pueden emplearse formas sustituidas de ácidos grasos en los compuestos que se describen en el presente documento. Al igual que con los grupos hidrocarbonados, se prefieren grupos sustituyentes que sean inertes in vivo e in vitro, prefiriéndose en particular flúor. Son estructuras genéricas de ejemplo de derivados polifluorados de ácidos grasos adecuados para su uso en los compuestos:

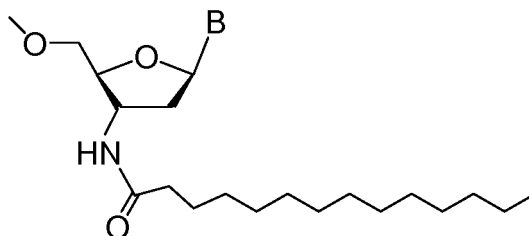
- 30 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ en la que m es al menos 1, preferentemente al menos 2 y n = 1-30, y $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{CO}-$ en la que a, b y c son independientemente 1 - 30.

35 Se muestran ejemplos de compuestos que se describen en el presente documento que tienen derivados polifluorados de ácidos grasos en las Figuras 1U y 1V.

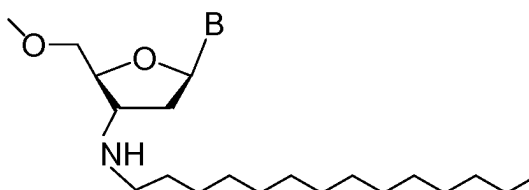
Normalmente se enlazan covalentemente entre uno y cinco componentes L (n = 1 - 5) al componente O, opcionalmente a través de un enlazador. Más habitualmente se utilizan 1 o dos componentes L (n = 1 o 2). Cuando se enlaza más de un componente L al componente O, cada componente L se selecciona independientemente.

40 Se apreciará que los compuestos que se describen en el presente documento que se describen como que tienen un hidrocarburo especificado como resto L y los compuestos que se describen como que tienen un ácido graso especificado (con el mismo número de átomos de carbono que el hidrocarburo especificado) están estrechamente relacionados y difieren en estructura solo en la naturaleza del enlace que une el resto L al oligonucleótido, que a su vez es resultado del procedimiento de síntesis utilizado para producir el compuesto. Por ejemplo, y como se describe en más detalle a continuación, cuando se sintetizan compuestos que tienen el resto L conjugado con el extremo amino 3' de un oligonucleótido (que tiene enlaces internucleosídicos fosforamidato o tiofosforamidato), el uso de la forma aldehído de un ácido graso (un aldehído graso) como material de partida da como resultado la formación de un enlace amina entre la cadena lipídica y el oligonucleótido, de manera que el grupo de lípidos aparece como un hidrocarburo. Por el contrario, el uso de las formas ácido carboxílico, anhídrido de ácido o cloruro de ácido del mismo ácido graso da como resultado la formación de un enlace amida, de manera que el grupo lipídico aparece

como un derivado de ácido graso, específicamente en este caso una amida grasa (como se ha indicado en la sección de definiciones anterior, por simplicidad, la expresión "ácido graso" cuando se describe el grupo L conjugado se usa ampliamente en el presente documento para incluir derivados de ácidos grasos, incluyendo amidas grasas). Esto se ilustra en los siguientes esquemas (y en las Figuras 2A y 2C), que representan el extremo amino 3' de un oligonucleótido fosforamidato unido a un componente lipídico C₁₄. En el esquema A, L es ácido tetradecanoico (ácido mirístico), en el que la conexión entre los grupos L y O es una amida. En el esquema B, L es tetradecano y la conexión entre los grupos L y O es una amina.



Esquema A



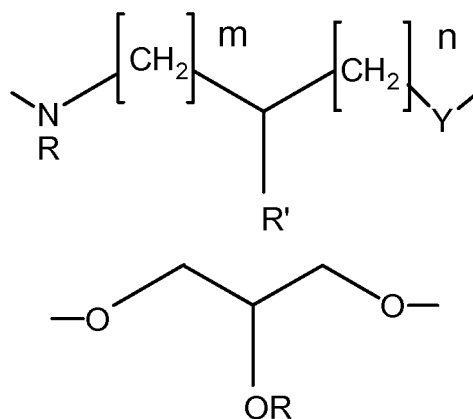
Esquema B

Enlace de los componentes O y L

- El enlace entre los componentes O y L puede ser un enlace directo o puede ser a través de un resto enlazador opcional, x. El grupo enlazador puede servir para facilitar la síntesis química de los compuestos (que se analiza en la sección de síntesis a continuación). Se use o no un grupo enlazador para mediar la conjugación de los componentes O y L, existen múltiples sitios en el componente oligonucleotídico O con los que pueden conjugarse convenientemente el componente o componentes L. Los puntos de enlace adecuados incluyen los extremos 5' y 3', uno o más anillos de azúcar, la cadena principal internucleosídica y las nucleobases del oligonucleótido. Normalmente, el resto L se une al extremo 3' o 5' terminal del oligonucleótido.

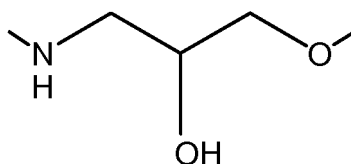
- Si el componente L se ha de unir al extremo 3', la unión puede ser directamente al sustituyente 3', que en el caso de los oligonucleótidos de fosforamidato y tiofosforamidato preferidos es el grupo 3'-amino (se muestran ejemplos en las Figuras 1AC) y, en otros casos, tales como oligonucleótidos de fosfodiéster convencionales, es un grupo 3-hidroxi. Como alternativa, el resto L puede enlazarse a través de un grupo fosfato enlazado a 3' (se muestra un ejemplo en la Figura 1Z, en la que un hidrocarburo hexadecano se enlaza al fosfato 3' de un oligonucleótido de tiofosforamidato a través de un enlazador O-alquilo. Si el resto L se ha de enlazar al extremo 5', normalmente se enlaza a través de un grupo fosfato enlazado a 5' (véase la Figura 1F, que muestra el uso de un enlazador de amino glicerol y la Figura 1G, que muestra el uso de un enlazador de bis-amino glicerol). La unión a una base en el resto O puede ser a través de cualquier átomo adecuado, por ejemplo, al grupo amino N² de guanosina (véanse las Figuras 1Q - R). Cuando n > 1 de manera que una pluralidad de restos lipídicos se ha de unir al componente O, los componentes L seleccionados individualmente pueden estar unidos en cualquier sitio o sitios adecuados. Por ejemplo, puede unirse un solo grupo L a cada extremo, pueden unirse diversos grupos L a las bases o pueden unirse dos o más grupos L en un solo extremo (véanse las Figuras 1E, 1J, 1K).

- El componente enlazador opcional x puede usarse para unir los componentes O y L de los compuestos. Si se ha de emplear un enlazador, se incorpora en los procedimientos de síntesis como se describe en la leyenda de la Figura 2, anterior. Los ejemplos de grupos enlazadores adecuados incluyen amino glicerol y enlazadores de tipo O-alquil glicerol que pueden representarse respectivamente por las estructuras genéricas:

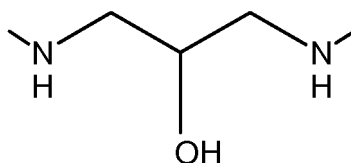


- 5 En las que $R' = H, OH, NH_2$ o SH ; $Y = O, S$ o NR ; $R = H$ o alquilo; y n y m son independientemente números enteros entre 1 - 18.

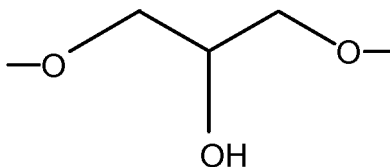
Son ejemplos específicos de enlazadores adecuados el enlazador de aminoglicerol en el que $R' = OH$, $Y = O$, y m y n son cada uno 1:



el enlazador de bis-aminoglicerol, en el que $R' = OH$, $Y = NH$, y m y n son cada uno 1:



y el enlazador de O-alquil glicerol en el que $R = H$:



C. Ejemplos de compuestos que se desvelan

Se muestran ejemplos de compuestos que se desvelan en la Figura 1. Por simplicidad, solo se muestra una base del oligonucleótido O, representándose una base genérica, B, e indicando R el punto de unión para el resto del oligonucleótido. Se ilustran compuestos enlazada al término 3' con un extremo 3'-nitrógeno, en consonancia con las químicas de oligonucleótido de tiofosforamidato y fosforamidato preferidas. Las Figuras 1A - 1L ilustran compuestos que tienen grupos lipídicos saturados unidos a los extremos 5' o 3'. Las Figuras 1M - 1P ilustran compuestos que tienen grupos lipídicos mono o poliinsaturados. Las Figuras 1Q - 1R ilustran compuestos que tienen grupos lipídicos conjugados con el oligonucleótido a través de una base (en el presente documento, guanosina). Las Figuras 1S y 1CC ilustran el resto lipídico colesterol conjugado en 3' y 5', respectivamente. Las Figuras 1U y 1V ilustran derivados de ácidos grasos sustituidos conjugados en 5' con polifluor, y la Figura 1W ilustra un hidrocarburo polifluorado conjugado en 5'. Las Figuras 1X - Z ilustran restos lipídicos 5' que contienen oxígeno. Las nomenclaturas utilizadas en el presente documento para cada uno de los grupos lipídicos ilustrados son como se indican a continuación:

- Figura 1A: 3'-miristoilamida
- Figura 1B: 3'-palmitoilamida
- Figura 1C: 3'-estearoilamida
- Figura 1D: 3'-palmitoilamido-propil-tiofosfato

Figura 1E: 3'-lisil-bis-estearoilamida
 Figura 1F: 5'-palmitoilamido-aminoglicerol-tiofosfato
 Figura 1G: 5'-palmitoilamido-bis-aminoglicerol-tiofosfato
 Figura 1H: 5'-estearoilamido-aminoglicerol-tiofosfato
 5 Figura 1I: 3'-dodecilo
 Figura 1J: 3'-bis-dodecilo
 Figura 1K: 3'-bis-decilo
 Figura 1L: 3'-eicosanoilamida
 Figura 1M: 3'-oleinilamida
 10 Figura 1N: 3'-linolenilamida
 Figura 1O: 3'-linoleilamida
 Figura 1P: 3'-tritol
 Figura 1Q: N²-tetradecil guanosina
 Figura 1R: N²-octadecil-guanosina
 15 Figura 1S: 3'-coilesterilamido-aminoglicerol-tiofosfato
 Figura 1T: 5'-(12-OH)-estearoil-tiofosfato
 Figura 1U: 5'-C11-teflon-tiofosfato
 Figura 1V: 5'-C13-teflon-tiofosfato
 Figura 1W: 5'-OH-C10-teflon-tiofosfato
 20 Figura 1X: 5'-OH-palmitil-tiofosfato
 Figura 1Y: 5'-batil-tiofosfato
 Figura 1Z: 3'-batil-tiofosfato
 Figura 1AA: 3'-palmitoilamido-aminoglicerol-tiofosfato
 Figura 1BB: 3'-tioctilamida
 25 Figura 1CC: 5'-coilesterilamido-aminoglicerol-tiofosfato
 Figura 1DD: 5'-(2-OH)-hexadecanol-tiofosfato

D. Síntesis de los compuestos que se desvelan

30 Los componentes oligonucleotídicos de los compuestos que se describen en el presente documento pueden sintetizarse usando protocolos convencionales para el tipo de química seleccionado. Se describen métodos para la síntesis de oligonucleótidos que tienen las químicas de fosforamidato N3' → P5' y tiofosforamidato N3' → P5' en McCurdy et al., (1997) *Tetrahedron Letters*, 38: 207-210 y Pongracz y Gryaznov, (1999) *Tetrahedron Letters*, 49: 7661-7664, respectivamente.

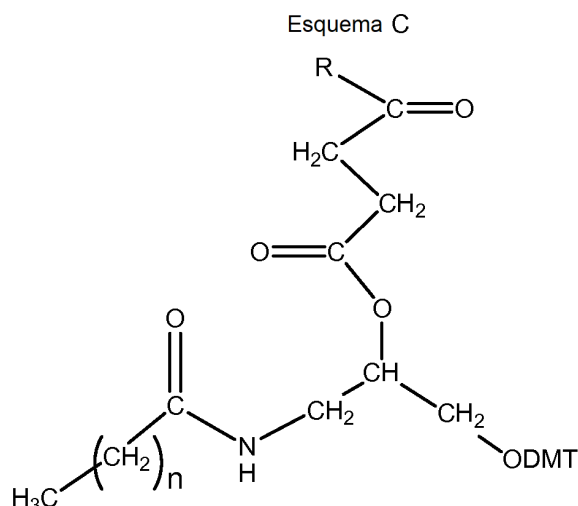
35 Puede usarse diversos enfoques de síntesis para conjugar el resto lipídico L con el oligonucleótido, dependiendo de la naturaleza de la unión seleccionada, incluyendo los enfoques que se describen en Mishra et al., (1995) *Biochemica et Biophysica Acta*, 1264: 229-237, Shea et al., (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 3777-3783 y Rump et al., (1998) *Bioconj. Chem.* 9: 341-349. La síntesis de los compuestos que se describen en el presente documento en la
 40 que el resto lipídico se conjuga en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido puede conseguirse a través del uso de grupos funcionales adecuados en el extremo apropiado, más normalmente un grupo amino, que puede hacerse reaccionar con ácidos carboxílicos, cloruros de ácido, anhídridos y ésteres activos. Los grupos tiol también son adecuados como grupos funcionales (véase Kupihar et al., (2001) *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 9: 1241-1247). Ambos modificadores de amino y tiol de diferentes longitudes de cadena están disponibles en el mercado
 45 para la síntesis de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforamidato N3' → P5' y tiofosforamidato N3' → P5' contienen grupos 3'-amina (en lugar del 3'-hidroxi encontrado en la mayoría de las químicas de oligonucleótidos convencionales) y, por tanto, estos oligonucleótidos proporcionan una oportunidad única para conjugar grupos lipídicos con el extremo 3' del oligonucleótido.

50 Pueden usarse diversos enfoques para unir grupos de lípidos a los extremos de los oligonucleótidos prefiriéndose las químicas de fosforamidato N3' → P5' y tiofosforamidato N3' → P5'. Se muestran ejemplos de esquemas de síntesis para la producción de los compuestos conjugados que se describen en el presente documento en la Figura 2. Para la unión al extremo 3', los compuestos conjugados pueden sintetizarse haciendo reaccionar el grupo 3'-amino libre del oligonucleótido unido al soporte sólido completamente protegido con el anhídrido de ácido correspondiente seguido de desprotección con amoníaco y purificación. Como alternativa, pueden usarse el
 55 acoplamiento de ácidos carboxílicos de lípidos al grupo 3'-amino libre del oligonucleótido unido a soporte usando agentes de acoplamiento tales como carbodiimidas, HBTU o yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio para conjugar los grupos lipídicos. Estos dos métodos formarán un enlace amida entre el lípido y el oligonucleótido. Los lípidos también pueden unirse a la cadena oligonucleotídica usando un derivado de fosforamidita del lípido acoplado a los
 60 oligonucleótidos durante la elongación de la cadena. Este enfoque produce un enlace fosforamidato o tiofosforamidato que conecta el lípido y el oligonucleótido (ejemplificado por compuestos de propil-palmitoilo y 2-hidroxi-propil-palmitoilo). Otro enfoque más implica la reacción del grupo 3'-amino libre del oligonucleótido unido a soporte totalmente protegido con un aldehído lipídico adecuado, seguido de reducción con cianoborohidruro de sodio, que produce un enlace amina.

65 Para la unión al extremo 5', el oligonucleótido puede sintetizarse usando un soporte sólido modificado que contiene

lípidido, seguido de la síntesis del oligonucleótido en la dirección 5 a 3' como se describe en Pongracz y Gryaznov (1999). Un ejemplo de soporte modificado se proporciona en el Esquema C a continuación. En el caso en el que $n = 14$, el ácido graso es ácido palmítico: la reacción de 3-amino-1,2-propanodiol con cloruro de palmítico, seguido de dimetoxitritilación y succinilación proporcionó el intermedio utilizado para el acoplamiento al soporte sólido. R es

5



E. Ensayos de inhibición de telomerasa

10

Los conjugados que se describen en el presente documento pueden usarse para inhibir o reducir la actividad de la enzima telomerasa y/o la proliferación de células que tienen actividad telomerasa. En estos contextos, la inhibición o reducción de la actividad enzimática o la proliferación celular se refieren a un nivel más bajo de la actividad medida con respecto a un experimento de control en el que la enzima o las células no se tratan con el conjugado. En realizaciones particulares, la inhibición o reducción de la actividad medida es al menos una reducción o inhibición del 10 %. Un experto en la materia apreciará que puede preferirse la reducción o inhibición de la actividad medida de al menos el 20 %, el 50 %, el 75 %, el 90 % o el 100 % para aplicaciones particulares. La capacidad de los compuestos que se describen en el presente documento para inhibir la telomerasa puede determinarse en un ensayo sin células (denominado ensayo bioquímico) y en células.

20

Los métodos para medir la actividad telomerasa y el uso de dichos métodos para determinar la actividad inhibidora de la telomerasa de compuestos son bien conocidos. Por ejemplo, el ensayo TRAP es un método de ensayo convencional para medir la actividad telomerasa en un sistema de extracto de células y se ha utilizado ampliamente en la búsqueda de compuestos inhibidores de la telomerasa (Kim et al., *Science* 266: 2011, 1997; Weinrich et al., *Nature Genetics* 17: 498, 1997). El ensayo TRAP mide la cantidad de nucleótidos radioactivos incorporada en los productos de elongación (polinucleótidos) formados por adición de nucleótidos a un sustrato o cebador de telomerasa. La radioactividad incorporada puede medirse como la intensidad de una banda en una pantalla de detección (por ejemplo, una pantalla Phosphorimager) expuesta a un gel sobre el que se separan los productos radioactivos. El ensayo TRAP también se describe en detalle en la Patente de los EE.UU. N.º 5.629.154, 5.837.453 y 5.863.726 y su uso en el ensayo de la actividad de compuestos inhibidores de la telomerasa se describe en diversas publicaciones incluyendo el documento WO 01/18015. Además, los siguientes kits están disponibles en el mercado con fines de investigación para medir la actividad telomerasa: kit de detección de telomerasa TRAPeze® XK; (n.º de cat. s7707; Intergen Co., Purchase NY); y Telo TAGGG Telomerasa PCR ELISA plus (n.º de cat. 2.013.89; Roche Diagnostics, Indianapolis IN).

35

Un protocolo preferido para medir la capacidad de los compuestos para inhibir la telomerasa en un ensayo bioquímico es el ensayo directo de telomerasa sin células (no basado en PCR), denominado el "ensayo Flashplate" y que se describe en Asai et al., *Cancer Research*, 63: 3931-3939 (2003).

40

La capacidad de los compuestos que se describen en el presente documento para inhibir la telomerasa en las células puede determinarse mediante la incubación del compuesto con células que expresan telomerasa por un periodo de tiempo definido y después la determinación de la actividad telomerasa en un extracto citosólico. Un protocolo preferido para el ensayo en células es el ensayo de telomerasa en células que se describe en Asai et al. (2003). Las estirpes de células tumorales que expresan telomerasa que son adecuadas para dichos ensayos incluyen células epiteliales de mama humanas HME50-5E (proporcionadas por el Dr. Jerry Shay, University of Texas Southwestern Medical Center), estirpes de células tumorales de ovario OVCAR-5 (MIISB, Milán) y SK-OV-3 (American Type Culture Collection, ATCC), células Caki-1 de carcinoma de riñón humano (Colección japonesa de recursos biológicos de investigación, JCRB), células 1549 de carcinoma de pulmón humano (ATCC), células A431

45

de carcinoma epidermoide humano (JCRB) y células DU145 de cáncer de próstata humano (ATCC).

F. Ensayos de proliferación celular

- 5 Una aplicación terapéutica clave de los compuestos que se describen en el presente documento es la inhibición del crecimiento de células que expresan telomerasa, en particular células tumorales. Los compuestos que se describen en el presente documento que inhiben la actividad telomerasa en las células, al igual que otros compuestos inhibidores de la telomerasa conocidos, inducirán crisis en estirpes celulares positivas para telomerasa, conduciendo al cese del crecimiento celular y la muerte. Sin embargo, de forma importante, en células humanas normales que no expresan telomerasa, tales como células BJ de origen fibroblástico, no se induce crisis ni ninguna otra toxicidad por el tratamiento con los compuestos que se describen en el presente documento. La capacidad de los compuestos para inhibir específicamente el crecimiento de células tumorales puede someterse a ensayo usando estirpes de células tumorales in vitro o en modelos animales de xenoinjerto in vivo.
- 10
- 15 Un protocolo preferido para dichos ensayos de curva de crecimiento es el ensayo de viabilidad celular a corto plazo que se describe en Asai et al. (2003). En la selección de un compuesto que se describe en el presente documento para aplicaciones terapéuticas, se prefiere que el compuesto produzca efectos citotóxicos significativos a concentraciones por debajo de aproximadamente 10 μ M en células normales que no expresan telomerasa.
- 20 La capacidad de los compuestos que se describen en el presente documento para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo* puede confirmarse usando modelos de xenoinjerto establecidos de tumores humanos, en los que el compuesto de ensayo se administra ya sea directamente al sitio del tumor o sistémicamente, y el crecimiento del tumor va seguido de medición física. Se espera que los animales tratados con compuestos que se describen en el presente documento tengan masas tumorales que, en promedio, puedan aumentar durante un periodo posterior a la dosificación inicial, pero comiencen a contraerse en masa con la continuación del tratamiento. Por el contrario, se espera que los ratones de control no tratados tengan masas tumorales que sigan aumentando. Un ejemplo preferido de un ensayo de xenoinjerto de tumor in vivo adecuado se describe en Asai et al. (2003). Se describen otros ejemplos en Scorski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 3966-3971 (1997) y Damm et al., *EMBO J.*, 20: 6958-6968 (2001).
- 25
- 30

G. Formulación de compuestos que se desvelan

- En el presente documento también se describen compuestos que pueden inhibir específica y potentemente la actividad telomerasa y que, por tanto, pueden usarse para inhibir la proliferación de células positivas para telomerasa, tales como células tumorales. Se ha demostrado que una diversidad muy amplia de células cancerosas es positiva para telomerasa, incluyendo células de cáncer de piel, tejido conjuntivo, adiposo, de mama, de pulmón, de estómago, de páncreas, de ovario, de cuello uterino, de útero, de riñón, de vejiga, de colon, de próstata, sistema nervioso central (SNC), retina y tumores hemáticos (tales como mieloma, leucemia y linfoma).
- 35
- 40 En consecuencia, los compuestos proporcionados en el presente documento son ampliamente útiles en el tratamiento de una amplia gama de tumores malignos. Más importante aún, los compuestos que se describen en el presente documento pueden ser eficaces para proporcionar tratamientos que discriminan entre células malignas y normales en un alto grado, evitando muchos de los efectos secundarios perjudiciales que se presentan con la mayoría de los regímenes quimioterápicos actuales que se basan en agentes que destruyen células que se dividen indiscriminadamente. Además, los compuestos que se describen en el presente documento son más potentes que los oligonucleótidos no conjugados equivalentes, lo que significa que pueden administrarse en dosis más bajas, proporcionando una mayor seguridad y reducciones significativas en el coste del tratamiento. En el presente documento también se describe un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto que se describe en el presente documento. Pueden emplearse inhibidores de la telomerasa, incluyendo compuestos que se describen en el presente documento, junto con otros métodos de tratamiento del cáncer, incluyendo la extirpación quirúrgica de tumores primarios, agentes quimioterápicos y radioterapia.
- 45
- 50
- Para la aplicación terapéutica, un compuesto que se describe en el presente documento se formula en una cantidad terapéuticamente eficaz con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden incluirse uno o más compuestos que se describen en el presente documento (por ejemplo, que tengan diferentes componentes L o O) en cualquier formulación dada. El vehículo farmacéutico puede ser sólido o líquido. Pueden usarse vehículos líquidos en la preparación de soluciones, emulsiones, suspensiones y composiciones presurizadas. Los compuestos se disuelven o suspenden en un excipiente líquido farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos adecuados de vehículos líquidos para la administración parenteral de las preparaciones de oligonucleótidos incluyen agua (que puede contener aditivos, por ejemplo, derivados de celulosa, preferentemente solución de carboximetilcelulosa de sodio), solución salina tamponada con fosfato (PBS), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ejemplo, glicoles) y sus derivados y aceites (por ejemplo, aceite de coco y aceite de cacahuete fraccionados). El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados, incluyendo los siguientes: solubilizantes, agentes de suspensión, emulsionantes, tampones, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, conservantes, estabilizantes y reguladores de osmolaridad.
- 55
- 60
- 65

Para la administración parenteral de los compuestos, el vehículo también puede ser un éster oleoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos estériles son útiles en composiciones en forma líquida estériles para la administración parenteral.

- 5 Pueden utilizarse composiciones, soluciones o suspensiones farmacéuticas líquidas estériles mediante, por ejemplo, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, por vía intravenosa o por vía tópica. Los oligonucleótidos también pueden administrarse por vía intravascular o por medio de una endoprótesis vascular.

- 10 El vehículo líquido para composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones presurizadas también pueden estar encapsuladas con lípido para la entrega a través de inhalación. Para la administración por inhalación o insuflación intranasal o intrabronquial, los oligonucleótidos pueden formularse en una solución acuosa o parcialmente acuosa, que después puede utilizarse en forma de un aerosol.

- 15 Los compuestos pueden administrarse por vía tópica en forma de una solución, crema o loción, mediante la formulación con vehículos farmacéuticamente aceptables que contienen el compuesto activo.

- 20 Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento pueden administrarse por vía oral en cualquier dosificación aceptable incluyendo formulaciones en cápsulas, comprimidos, polvos o gránulos y en forma de suspensiones o soluciones en medios acuosos o no acuosos. Las composiciones y/o formulaciones farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos que se describen en el presente documento pueden incluir vehículos, lubricantes, diluyentes, espesantes, agentes aromatizantes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. En el caso de comprimidos para su uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración por vía oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para su uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

- 30 Aunque los compuestos que se describen en el presente documento tienen características superiores para la penetración celular y tisular, pueden formularse para proporcionar un beneficio aún mayor, por ejemplo, en vehículos de liposomas. El uso de liposomas para facilitar la captación celular se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 4.897.355 y la Patente de los EE.UU. N.º 4.394.448. Numerosas publicaciones describen la formulación y preparación de liposomas. Los compuestos también pueden formularse mediante la mezcla con potenciadores de la penetración adicionales, tales como formas no conjugadas de los restos lipídicos que se han descrito anteriormente, incluyendo ácidos grasos y sus derivados. Los ejemplos incluyen ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, recinleato, monooleína (también conocido como 1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, mono y diglicéridos y sales fisiológicamente aceptables de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.).

- 45 Pueden usarse formulaciones complejas que comprendan uno o más agentes potenciadores de la penetración. Por ejemplo, pueden usarse sales biliares en combinación con ácidos grasos para hacer formulaciones complejas. Las combinaciones de ejemplo incluyen el ácido quenodesoxicólico (CDCA), generalmente utilizado a concentraciones de aproximadamente el 0,5 al 2 %, combinado con caprato de sodio o laurato de sodio, utilizado generalmente a concentraciones de aproximadamente el 0,5 al 5 %.

- 50 Las composiciones y/o formulaciones farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos que se describen en el presente documento también pueden incluir agentes quelantes, tensioactivos y no tensioactivos. Los agentes quelantes incluyen etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovainillato), N-acil derivados de colágeno, laureth-9 y N-amino acil derivados de beta-dicetonas (enaminas). Los tensioactivos incluyen, por ejemplo, lauril sulfato de sodio, polioxietileno-9-lauril éter y polioxietileno-20-cetil éter; y emulsiones de productos químicos perfluorados, tales como FC-43. Los no tensioactivos incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquil y 1-alquenilazacicloalcanona y agentes no esteroideos antiinflamatorios tales como diclofenaco de sodio, indometacina y fenilbutazona.

- 60 Por tanto, en el presente documento también se describe un método para formular una composición farmacéutica, comprendiendo el método proporcionar un compuesto como se describe en el presente documento y combinar el compuesto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el compuesto se proporciona con pureza farmacéutica, como se define a continuación. El método puede comprender adicionalmente la adición al compuesto, ya sea antes o después de la adición del excipiente, de un agente potenciador de la penetración.

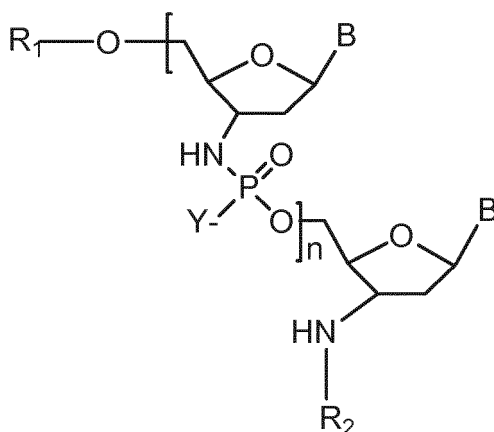
- 65 La composición farmacéutica normalmente cumplirá con normas de pureza farmacéutica. Para su uso como un principio activo en una preparación farmacéutica, un compuesto que se describe en el presente documento generalmente se purifica lejos de otros componentes reactivos o potencialmente inmunogénicos presentes en la

mezcla en la que se preparan. Normalmente, para lograr pureza farmacéutica donde un compuesto a base de ácido nucleico es el principio activo, el principio activo se proporciona con una homogeneidad de al menos aproximadamente el 50 % y más preferentemente una homogeneidad del 60 %, del 70 %, del 80 % o del 90 %, como se determina por ensayo funcional, cromatografía o electroforesis en gel. El principio activo después se conforma en un medicamento de acuerdo con procedimientos generalmente aceptados para la preparación de preparaciones farmacéuticas. Por tanto, como se describe en el presente documento, proporcionar los compuestos con pureza farmacéutica requiere que se proporcione el compuesto con una homogeneidad de al menos aproximadamente el 50 % y más preferentemente una homogeneidad de al menos el 80 % o el 90 %.

- 10 La composición farmacéutica normalmente también se dividirá en alícuotas y se envasará en unidades ya sea de dosis única o de dosis múltiples. Los requisitos de dosificación para el tratamiento con el compuesto oligonucleotídico varían con las composiciones particulares empleadas, la vía de administración, la gravedad de los síntomas presentados, la forma del compuesto y el sujeto particular que se está tratando.
- 15 Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento pueden administrarse a un sujeto en una formulación y en una cantidad eficaz para conseguir un resultado clínicamente deseable. Para el tratamiento del cáncer, los resultados deseables incluyen la reducción de la masa tumoral (según se determina por palpación o formación de imágenes, por ejemplo, mediante radiografía, exploración con radionucleótidos, exploración por TAC o RM), la reducción en la tasa de crecimiento tumoral, la reducción en la tasa de formación de metástasis (según se determina, por ejemplo, mediante análisis histoquímico de las muestras de biopsia), la reducción de los marcadores bioquímicos (incluyendo marcadores generales tales como ESR y marcadores específicos de tumores tales como el PSA sérico) y la mejora de calidad de vida (según se determina por la evaluación clínica, por ejemplo, puntuación de Karnofsky), el aumento de tiempo hasta la progresión, la supervivencia sin enfermedad y la supervivencia global.
- 25 La cantidad de compuesto por dosis y el número de dosis necesarias para conseguir dichos efectos variarán en función de muchos factores, incluyendo la indicación de la enfermedad, las características del paciente que se está tratando y del modo de administración. Normalmente, la formulación y la vía de administración proporcionarán una concentración local en el sitio de la enfermedad de entre 1 μM y 1 nM del compuesto.
- 30 En general, los compuestos se administran a una concentración que proporciona resultados eficaces sin provocar ningún efecto secundario dañino o perjudicial. Una concentración de este tipo puede conseguirse mediante la administración ya sea de una dosis unitaria individual, o mediante la administración de la dosis dividida en subunidades convenientes a intervalos adecuados durante todo el día.

35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la síntesis y actividades de los compuestos que se describen en el presente documento en los que el componente oligonucleotídico O se sintetiza usando las químicas de tiofosforamidato o fosforamidato preferidas. En ejemplos particulares, se conjugan restos lipídicos ya sea en el extremo 3' o 5', o ambos, ya sea con o sin un enlazador. La estructura general de estos compuestos puede representarse como:



- 45 en la que R_1 y R_2 son independientemente H o un resto lipídico (L), Y es O (oligonucleótido de fosforamidato) o S (oligonucleótido de tiofosforamidato), n es un número entero, normalmente entre 4 y 49 y B representa una base (seleccionada independientemente para cada subunidad nucleosídica). El enlazador opcional no se representa en esta estructura.

- 50 Los compuestos que se desvelan en el presente documento no abarcados por el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la invención y se citan como compuestos de referencia.

Ejemplo 1 Síntesis de compuestos

A. Métodos generales

- 5 Se sintetizaron fosforamidatos (NP) y tiofosforamidatos (NPS) N3' → P5' de oligonucleótidos a una escala 1 μmolar usando la reacción de transferencia de amidita en un sintetizador ABI 394 de acuerdo con los procedimientos descritos por McCurdy et al., (1997) *Tetrahedron Letters*, 38: 207-210 y Pongrácz y Gryaznov, (1999) *Tetrahedron Letters* 49:7661-7664, respectivamente. Los componentes básicos monoméricos totalmente protegidos fueron 3'-aminotritil-nucleósido-5'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)nucleosidofosforamiditas, específicamente 3'-desoxi-
 10 timidina, 2',3'-didesoxi-N²-isobutirilguanosina, 2',3'-didesoxi-N²-benzoil-adenosina y 2',3'-didesoxi-N⁴-benzoil-citidina adquiridas de Transgenomic, Inc. (Omaha, Nebraska). Se acoplaron 3'-aminotritil-5'-succinil-nucleósidos con vidrio poroso controlado con alquil amina de cadena larga y se usaron como el soporte sólido. La síntesis se realizó en la dirección 5' a 3'. Se sintetizaron oligonucleótidos con cadenas principales de NP usando el procedimiento del patrón 1 μM (ABI Perkin Elmer) con una etapa de oxidación con yodo/H₂O, mientras se preparaban oligonucleótidos con cadenas principales de NPS usando el protocolo de azufre en el que se usó una solución 0,1 M de disulfuro de
 15 fenilacetilo (PADS) en una mezcla de acetonitrilo:2,6-lutidina 1:1 como reactivo de sulfuración. El tiempo de acoplamiento fue de 25 segundos para la preparación de ambos tipos de cadena principal. Se usó una mezcla 18:1:1 de THF:anhídrido isobutírico:2,6-lutidina como agente de terminación. Se usaron tres métodos para conjugar el resto lipídico con el oligonucleótido: método (i) acoplar usando reactivos de fosforamidita en el sintetizador para introducir el resto lipídico en el extremo 3'; método (ii) usar un soporte sólido modificado (ejemplificado en el Esquema C anterior) con el que se conjugó el grupo lipídico antes del inicio de la síntesis por elongación para la producción de conjugados 5'; y método (iii) reacción del grupo 3'-amino libre mientras todavía está en el soporte sólido seguida de desprotección. Se proporcionan detalles adicionales de estos métodos a continuación. Los oligonucleótidos se desprotegeron con amoníaco concentrado para grupos lipídicos unidos al extremo 3' o una
 20 nucleobase, o una mezcla 1:1 de etanol:amoníaco concentrado para grupos lipídicos unidos al extremo 5', a 55 °C durante 6 - 8 horas. Los productos en bruto se desalaron ya sea en columnas de filtración en gel Pharmacia NAP-25 o se precipitaron con etanol a partir de cloruro de sodio 1 M y después se liofilizaron al vacío.

- Los productos oligonucleotídicos se purificaron posteriormente mediante HPLC de fase inversa usando una columna
 30 Beckman Ultrasphere C18 (5 μ) de 250 x 10 mm. Los productos se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo en acetato de trietilamonio 50 mM a un caudal de 2 ml/min y se convirtieron en sal de sodio con precipitación en cloruro de sodio 1 M con etanol frío absoluto. La pureza de los compuestos se evaluó por HPLC FI analítica usando el sistema de disolvente anterior y mediante PAGE. Se registraron espectros de RMN ¹H y ³¹P en un instrumento VARIAN Unity Plus 400 MHz y se obtuvieron espectros de masas con ionización por electronebulización (EM IEN) usando un espectrómetro de masas WATERS Micromass ZMD.

B. Conjugación de grupos lipídicos con el oligonucleótido

- Como se ha señalado anteriormente, pueden emplearse diversos métodos para conjugar los grupos lipídicos con el
 40 oligonucleótido. Los detalles de métodos específicos son como se indican a continuación:

- Método (i) En este método se añaden reactivos de fosforamidita que contienen un grupo lipídico conjugado como el nucleósido 3' durante el proceso de síntesis de oligonucleótidos, dando como resultado un grupo lipídico conjugado con el extremo 3' del oligonucleótido. La síntesis y posterior acoplamiento de dos fosforamiditas que
 45 contienen ácido graso ejemplifican este enfoque.

(i/a) Síntesis y acoplamiento de 3-palmitoilamino-propano-1-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita).

- A 1,0 g (13,3 mmol) de 3-amino-propanol disuelto en mezcla 1:4 de cloruro de metileno-acetonitrilo (400 ml), se le
 50 añadieron 10 ml de diisopropiletilamina y 4,06 ml (13,3 mmol) de cloruro de palmitoilo. Después de agitar la reacción durante la noche se añadió más cloruro de metileno y después la mezcla se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio saturado, salmuera y agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad. Se destilaron azeotrópicamente 500 mg (1,6 mmol) del sólido de color blanco obtenido por coevaporación con acetonitrilo seco y se disolvieron en 50 ml de cloruro de metileno. Después de la adición de 1,1 ml de
 55 diisopropiletilamina (4 eq.) se añadieron 390 μl (1,7 mmol) de 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita gota a gota. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h para proporcionar una solución transparente. La mezcla de reacción se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando el sistema de disolventes acetato de etilo:cloruro de metileno:triethylamina 45:45:10 v/v. Los 0,7 g (90 %) de sólido similar a la cera se secó en un desecador sobre P₂O₅ antes de su uso en el sintetizador de ADN. RMN ³¹P (CDCl₃) 148,45 ppm, EM EN (MH⁺) 514. Para el acoplamiento en el sintetizador de ADN, se preparó una solución 0,1 M en mezcla 1:9 de acetonitrilo anhidro-cloruro de metileno. Esta síntesis da como resultado el reactivo utilizado para la producción del oligonucleótido conjugado representado en la Figura 1D.

- 65 (i/b) Síntesis y el acoplamiento de 3-palmitoilamino-1-hidroxi-propano-2-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita).

Se suspendió 1 g (10,97 mmol) de 3-amino-propanodiol en 10 ml de piridina y se añadieron 3,017 g (10,97 mmol) de cloruro de palmitoilo en 2 ml de DMF gota a gota con agitación vigorosa. Después de 15 minutos de agitación, el gel se filtró y se secó al aire. El sólido se recrystalizó en etanol caliente y 2-propanol caliente en forma de un polvo de color blanco. El sólido de color blanco se coevaporó con piridina, después se disolvió en 30 ml de piridina seca. Se añadieron 2,89 g (8,55 mmol) de cloruro de DMT y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, siguiéndose la reacción por CCF. Después de inactivar con metanol, la piridina se evaporó y la reacción se trató a partir de cloruro de metileno-bicarbonato de sodio saturado. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente. Los 2,4 g (3,64 mmol) obtenidos de aceite de color amarillo se sometieron a destilación azeotrópica con piridina, se disolvieron en 100 ml de cloruro de metileno y 4 eq (2,5 ml) de diisopropiletilamina. A la solución agitada se le añadieron 920 µl (4 mmol) de 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita gota a gota. La reacción se siguió por CCF y se descubrió que era completa después de 2 h y se trató como anteriormente. El producto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando un sistema de disolventes acetato de etilo:cloruro de metileno:trietilamina 45:45:10. El sólido obtenido se secó en un desecador antes de su uso en el sintetizador de ADN (solución 0,1 M en acetonitrilo). RMN ³¹P (CDCl₃) 149,9, 150,2 ppm, EM EN (MNa⁺) 854,57. Esta síntesis da como resultado el reactivo utilizado para la producción del oligonucleótido conjugado representado en la Figura 1AA.

Método (ii) En este método, un soporte sólido modificado conjugado con el resto lipídico se usa como punto de partida para la síntesis de 5' a 3' del oligonucleótido, dando como resultado un conjugado 5'. La síntesis y el uso de dos soportes sólidos modificados ejemplifican este enfoque.

(ii/a) Síntesis de 3-palmitoilamino-1-dimetoxitritiloxi-2-succiniloxi-propano

Se suspendió 1 g (10,97 mmol) de 3-amino-1,2-propanodiol en 10 ml de piridina. Se añadieron 3,017 g (10,97 mmol) de cloruro de palmitoilo en 2 ml de DMF gota a gota con agitación vigorosa. Después de 15 minutos de agitación, el gel se filtró y se secó al aire. El sólido se recrystalizó en etanol caliente y 2-propanol caliente en forma de un polvo de color blanco. El sólido de color blanco se coevaporó con piridina, después se disolvió en 30 ml de piridina seca. Se añadieron 3,2 g (9,46 mmol) de DMT-cloruro y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos siguiéndose la reacción por CCF. Después de inactivar con metanol, la piridina se evaporó y la reacción se trató con cloruro de metileno-bicarbonato de sodio saturado. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente. Los 2,5 g (3,95 mmol) de aceite de color amarillo obtenido se disolvieron en 30 ml de cloruro de metileno y se añadieron después 475 mg de anhídrido succínico y 483 mg dimetilaminopiridina y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. La reacción se controló por CCF y se añadió más anhídrido succínico si era necesario. La solución de cloruro de metileno se lavó con tampón de citrato de sodio frío (pH = 4) y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio que se evaporó a sequedad. El producto final obtenido fue 2,0 g (24,9 %).

(ii/b) Síntesis de 3-stearoilamino-1-dimetoxitritiloxi-2-succiniloxi-propano

Se suspendió 1 g (10,97 mmol) de 3-amino-propanodiol en 10 ml de piridina. Se añadieron 3,32 g (10,97 mmol) de cloruro de estearoilo en 10 ml de DMF gota a gota con agitación vigorosa. Después de 15 minutos de agitación, el gel se filtró y se secó al aire. El sólido se recrystalizó en etanol caliente y 2-propanol caliente en forma de un polvo de color blanco. El sólido de color blanco se coevaporó con piridina, después se disolvió en 30 ml de piridina seca. Se añadieron 2,89 g (8,55 mmol) de DMT-cloruro y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos siguiéndose la reacción por CCF. Después de inactivar con metanol, la piridina se evaporó y la reacción se trató con cloruro de metileno-bicarbonato de sodio saturado. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente. Los 2,4 g (3,64 mmol) de aceite de color amarillo obtenidos se disolvieron en 30 ml de cloruro de metileno y después se añadieron 437 mg de anhídrido succínico y 444 mg de dimetilaminopiridina y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. La reacción se controló por CCF y se añadió más anhídrido succínico si era necesario. La solución de cloruro de metileno se lavó con tampón de citrato de sodio frío (pH = 4) y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio que se evaporó a sequedad. El producto final obtenido fue 1,2 g (14,4 %).

Los productos sintetizados en (II/a) y (II/b) después se conjugaron con vidrio poroso controlado con amino de cadena larga (LCAA-CPG) para producir el soporte sólido modificado, como se indica a continuación:

En un recipiente de síntesis de péptidos de 100 ml, se lavaron 20 g de LCAA-CPG (Transgenomic, Inc., carga de -NH₂ ~200 mmol/g) con dimetilformamida seca. En un matraz separado se disolvieron 5,55 mmol de los productos que se han descrito en (II/a) o (II/b) anteriormente en 40 ml de cloroformo, 3 ml de diisopropiletilamina y se añadieron 2,13 g (8,3 mmol) de yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio. Esta suspensión se vertió sobre el CPG seco en el recipiente de síntesis de péptidos (con la válvula abierta) hasta que la solución empapó aproximadamente la mitad del CPG. Después, la válvula y la tapa superior se cerraron y el recipiente se agitó hasta que la solución cubrió el CPG completamente. (Si es necesario puede añadirse más cloroformo, pero el volumen debe mantenerse al mínimo). Después, el recipiente se colocó en un agitador y la reacción se dejó transcurrir durante la noche a temperatura ambiente. El CPG se filtró y después se lavó con cloruro de metileno, metanol y acetonitrilo. Los grupos amino que no han reaccionado se taparon usando una solución 1:1 de THF-

2,6-lutidina-anhídrido isobutírico 18:1:1 y Cap B (N-metilimidazol/THF) durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. Después de la filtración adicional, las perlas se lavaron con metanol, cloruro de metileno y acetonitrilo. La carga se determinó mediante el método convencional de medición de la absorbancia del catión dimetoxitritilo a 498 nm de una muestra desbloqueada usando ácido perclórico metanólico y se descubrió que era de 50-60 µmol/g.

Una vez que se produjeron los soportes sólidos modificados, se emplearon en la síntesis de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente. Se muestran ejemplos de los conjugados de oligonucleótidos producidos de esta manera en las Figuras 1F, 1G y 1H.

Método (iii) En este método, la síntesis del oligonucleótido se completa y mientras permanece completamente protegido y unido al soporte sólido, el extremo 3' se hace reaccionar con una forma de anhídrido de ácido (iii/a), anhídrido (iii/b), ácido (iii/c) o aldehído (iii/d) del grupo lipídico, como se indica a continuación.

(iii/a) El oligonucleótido totalmente protegido unido al soporte sólido que contenía el grupo 3'-amino libre (4 µmol) se secó al vacío y se suspendió en 3 ml de cloroformo anhidro. Después de la adición de 140 µl (0,8 mmol) de diisopropiletilamina y 0,4 mmol del cloruro de ácido apropiado (122 µl de cloruro de palmitoilo, por ejemplo) la mezcla se agitó durante 2 minutos y se filtró rápidamente, después se lavó con cloroformo, metanol y acetonitrilo. Las perlas secas se suspendieron en 1-2 ml de hidróxido de amonio concentrado y se calentaron durante 5 horas a 55 °C. Después, la solución de hidróxido de amonio enfriada se filtró y se evaporó. El producto lipídico conjugado se aisló mediante HPLC. Usando las condiciones descritas anteriormente el producto se eluyó en aproximadamente 40 minutos. Después de la evaporación el producto se precipitó en cloruro de sodio 1 M y etanol para proporcionar la sal de sodio.

(iii/b) Al oligonucleótido totalmente protegido unido al soporte sólido seco (1 µmol) se le añadieron 0,1 mmol del anhídrido apropiado y 170 µl de diisopropiletilamina disuelta en 2 ml de cloroformo y el vial que contenía la mezcla se puso en un agitador durante la noche. Después de la filtración, las perlas se lavaron con cloroformo, metanol y acetonitrilo y el oligonucleótido conjugado se desbloqueó y se purificó como anteriormente.

(iii/c) Se hizo reaccionar 1 µmol de oligonucleótido totalmente protegido unido al soporte sólido en un agitador con una solución de 0,1 mmol del ácido adecuado, 25 mg de yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (0,1 mmol) y 170 µl de diisopropiletilamina en 2 ml de cloroformo durante la noche. Se realizaron el lavado, el desbloqueo y la purificación como se ha descrito anteriormente.

(iii/d) Una solución de 0,3 mmol del aldehído deseado, 31,5 mg de cianoborohidruro de sodio y 100 µl de acetato de sodio 0,5 M en 2 ml de tetrahidrofurano se añadieron a 1 µmol de oligonucleótido totalmente protegido unido al soporte sólido y se colocaron en un agitador durante 30 minutos. Se realizaron el lavado, el desbloqueo y la purificación como se ha descrito anteriormente.

Método (iv) En este método, el grupo lipídico se conjuga no con un extremo del oligonucleótido, sino con una nucleobase de la cadena, por ejemplo, una guanosina. Estos compuestos se sintetizan usando un protocolo de extensión de la cadena de oligonucleótidos convencional, como se ha descrito anteriormente, pero con la incorporación de una base modificada con un grupo lipídico conjugado covalentemente, tal como se representa en la Figura 2E. Se muestran ejemplos de compuestos en los que el grupo lípido se conjuga con una nucleobase en las Figuras 1Q y R.

Ejemplo 2 Actividad de los compuestos en ensayos bioquímicos y en células

Se sometieron a ensayo oligonucleótidos conjugados como se describen en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la telomerasa en el ensayo bioquímico Flashplate y el ensayo en células, como se ha descrito anteriormente y en Asai et al. (2003). Los resultados se presentan en la siguiente tabla. En esta tabla, se usan las siguientes abreviaturas:

Secuencias oligonucleotídicas:

1 = TAGGGTTAGACAA, complementarias con las bases 42 - 54 de hTR, SEQ ID NO: 1

2 = CAGTTAGGGTTAG, complementarias con las bases 38 - 50 de hTR, SEQ ID NO: 1

Química:

NP indica que el oligonucleótido tiene enlaces internucleosídicos fosforamidato

NPS indica que el oligonucleótido tiene enlaces internucleosídicos tiofosforamidato

Conjugado:

5' indica que el resto lipídico se conjuga con el extremo 5' del oligonucleótido

3' indica que el resto lipídico se conjuga con el extremo 3' del oligonucleótido

Tipos de células cancerosas humanas (todas disponibles de ATCC):

HT-3 y A431: carcinoma del cuello uterino
 U-251: glioblastoma multiforme
 DU145 y LNCaP: cáncer de próstata
 Caki: carcinoma renal de células claras
 NCIH522: adenocarcinoma de pulmón
 Ovar-5: carcinoma de ovario
 Hep3B: carcinoma hepatocelular

En la siguiente tabla, un asterisco (*) indica un compuesto de referencia.

Secuencia oligonucleotídica	Química	Grupo lipídico conjugado (referencia de la Figura 1)	CI50 (nM) en ensayo bioquímico	CI50(μM) en ensayo celular (tipo celular)
1 (*)	NPS	ninguno	0,15	1,6 (HT-3) 0,79 (A431) 6,3 (U-251) 1,4 (DU145) 2,99 (Caki) 6,5 (Hep3B)
1 (*)	NPS	3'-miristoilamida (1A)	0,8 (+/- 0,2)	0,35 (Caki) 0,21 (HT-3)
1	NPS	3'-palmitoilamida (1B)	2,9 (+/- 2,2)	0,21 (A431) 0,37 (HT-3) 0,19 (LNCaP) 0,2 (NCI-H522) 0,65, 0,49 (U-251) 2,84 (Hep3B) 1,97 (Ovar5)
1 (*)	NPS	3'-estearoilamida (1C)	11,9 (+/- 10,5)	0,13, 0,28 (HT-3) 0,2 (NCI-H522)
1 (*)	NPS	3'-palmitoilamido-propil-tiofosfato (1D)	0,48 (+/- 0,3)	0,27 (HT-3)
1 (*)	NPS	3'-tioctilamida (1BB)	1,19 (+/- 0,7)	N/D
1 (*)	NPS	3'-lilis-bis-estearoilamida (1E)	2,45 (+/- 0,7)	2,98 (HT-3)
1 (*)	NPS	3'-oleinilamida (1M)	5,2 (+/- 0,8)	1,16 (HT-3)
1 (*)	NPS	3'-linoleilamida (1O)	3,9	1,25 (HT-3)
1 (*)	NPS	3'-bis-decilo (1K)	36,5 (+/- 8,9)	N/D
1 (*)	NPS	3'-bis-dodecilo (1J)	>100	N/D
1 (*)	NPS	3'-palmitoilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1AA)	0,4 (+/- 0,14)	0,5 (HT-3)
1 (*)	NPS	3'-tritilo (1P)	0,9 (+/- 0,01)	>10 (HT-3)

Secuencia oligonucleotídica	Química	Grupo lipídico conjugado (referencia de la Figura 1)	CI50 (nM) en ensayo bioquímico	CI50(μM) en ensayo celular (tipo celular)
1	NPS	5'-palmitoilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1F)	5,01 (+/- 3,37)	0,36, 0,22 (HT-3) 0,15 (DU145) 0,16 (U-251) 3,02 (Hep3B) 0,92 (Ovar5)
1 (*)	NPS	5'-OH-palmitilo-tiofosfato (1X)	3,6	
1 (*)	NPS	5'-stearoilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1H)	5,2 (+/- 4,1)	N/D
1 (*)	NPS	5'-coesterilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1CC)	2,6 (+/- 0,14)	0,25 (HT-3)
1 (*)	NPS	5'-palmitoilamido-bisaminoglicerol-tiofosfato (1G)	4,65 (+/- 0,35)	0,55 (HT-3)
1 (*)	NPS	5'-C11-teflon-tiofosfato (1U)	4,15 (+/- 1,91)	0,14 (HT-3)
1 (*)	NPS	5'-C13-teflon-tiofosfato (1V)		0,23 (HT-3)
1 (*)	NPS	5'-batil-tiofosfato (1Y)		0,59 (HT-3)

1 (*)	NPS	tiofosfato de 5',3'-bis-palmitoilamido-glicerol (no mostrado en la figura)	0,3 (+/- 0,14)	0,34 (HT-3)
1 (*)	NPS	3'-palmitoilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1AA)	0,4 (+/- 0,14)	0,52
1 (*)	NP	ninguno	0,8	30
1 (*)	NP	3'-palmitoilamida (1B)	2,85 (+/- 1,06)	N/D
1 (*)	NP	3'-dodecilo (1I)	3,2 (+/- 0,57)	N/D
1 (*)	NP	3'-bis dodecilo (1J)	>100	N/D
1 (*)	NP	3'-bis decilo (1K)	>100	N/D

Secuencia oligonucleotídica	Química	Grupo lipídico conjugado (referencia de la Figura 1)	CI ₅₀ (nM) en ensayo bioquímico	CI ₅₀ (uM) en ensayo celular (tipo celular)
1 (*)	NP	3'-coilesterilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1S)	>10	3,6 (HT-3)
1 (*)	NP	5'-palmitoilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1F)	6,25 (+ /2,33)	6,5 (HT-3)
1 (*)	NP	5'-estearoilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1H)	2,4 (+/- 1,13)	3,02 (HT-3)
1 (*)	NP	5'-coilesterilamido-aminoglicerol-tiofosfato (1CC)	>10	0,8 (HT-3)
1 (*)	NP	3'-lisil-bis-estearoilamida (1E)	50	

Ejemplo 3 Estudios comparativos de potencia y biodisponibilidad

- 5 Se seleccionaron dos compuestos que se describen en el presente documento, junto con un oligonucleótido no conjugado, para estudios detallados separados. Los compuestos seleccionados, representados en la Figura 9, fueron como se indican a continuación:

- 10 Compuesto A (no conjugado): un oligonucleótido de tiofosforamido de secuencia TAGGGTTAGACAA (esta secuencia es complementaria a las bases 42 - 54 de hTR, SEQ ID NO: 1). (Figura 9A).
 Compuesto B: el oligonucleótido del compuesto A conjugado con 3'-palmitoilamida (Figura 9B).
 Compuesto C: el oligonucleótido del compuesto A conjugado con 5'-palmitoilamido-aminoglicerol-tiofosfato (Figura 9C).

- 15 Se presentan estudios sobre estos compuestos en este y en los siguientes Ejemplos.

- 20 La siguiente tabla muestra las temperaturas de fusión de cada uno de estos tres compuestos cuando se asocian con el ARN emparejado (determinadas usando métodos convencionales), el valor de CI₅₀ para la inhibición de la telomerasa determinado usando el ensayo bioquímico y la CI₅₀ para la inhibición de la telomerasa determinada usando el ensayo celular (con células HT-3) como se ha descrito anteriormente.

Compuesto	Tf del dúplex (°C)	CI ₅₀ (nm) ensayo bioquímico	CI ₅₀ (um) ensayo en células
A	70	0,15	1,6
B	66,5	1,7	0,16
C	65,5	0,9	0,11

- 25 Como se muestra en la tabla, el oligonucleótido no conjugado A mostró una afinidad de unión a su diana muy alta, con una temperatura de fusión de 70 °C y un valor de CI₅₀ para la inhibición de la telomerasa de 0,15 nM en un ensayo bioquímico (donde la captación celular no es un problema). Aunque el Compuesto A tuvo una buena captación en las células intactas, con una CI₅₀ micromolar baja para la inhibición de la telomerasa en múltiples estirpes celulares tumorales diferentes (1,6 μM en células HT-3 en este experimento), esto reflejó una pérdida de potencia de aproximadamente 10.000 veces en células intactas con respecto a la potencia bioquímica. La adición del grupo lipídico ya sea al extremo 5' o 3' del oligonucleótido (compuestos C y B, respectivamente) redujo modestamente la Tf, que todavía seguía siendo muy alta a 65,5 - 66,5 °C y redujo la potencia bioquímica de 6 a 11 veces en comparación con el compuesto A no conjugado. Con una importancia crítica, sin embargo, la potencia del conjugado de lípido con compuestos B y C en células intactas se redujo solamente ~100 veces en comparación con la potencia bioquímica de estos compuestos. Como resultado de una mayor captación celular, los compuestos B y C demostraron una potencia al menos 10 veces mayor en las células HT-3 en comparación con el oligonucleótido no conjugado (compuesto A).

Se observaron resultados similares con otros tipos de células cancerosas humanas. Las Figuras 3 y 4 muestran datos obtenidos con los compuestos A, B y C en células U251 intactas (glioblastoma humano) y células DU145

(cáncer de próstata humano), respectivamente. La CI_{50} del compuesto C (forma lipídica en 5') fue aproximadamente 10 veces menor que la del compuesto A en las células U251 y aproximadamente 38 veces menor en las células DU145, confirmando el aumento de la eficacia del tratamiento con el compuesto C.

5 Ejemplo 4 Inhibición de la actividad telomerasa en tumores humanos en modelos animales

Las capacidades del compuesto oligonucleotídico no conjugado A y del compuesto oligonucleotídico conjugado con lípido C para inhibir la telomerasa en tumores que crecen en animales se compararon en el siguiente experimento. Se inocularon ratones atímicos (*nu/nu*) con células tumorales DU-145 en ambos flancos. Cuando los tumores (dos tumores/ratón) alcanzaron 50 - 100 mm³ de tamaño, los ratones recibieron una única inyección en vena en la cola de PBS, compuesto A marcado con FITC o compuesto C marcado con FITC (ambos compuestos administrados a 40 mg/kg). Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la inyección IV; se recogió un tumor para la formación de imágenes fluorescentes y el otro tumor se analizó para determinar la actividad de telomerasa mediante un ensayo TRAP.

Los niveles de fluorescencia fueron comparables en ambos grupos de tratamiento. Sin embargo, como se muestra en la Figura 5, el compuesto C dio como resultado una mayor inhibición de la actividad telomerasa que el compuesto A. Las flechas verticales en las calles que corresponden a 0,75 ug de lisado de tumor indican que estas muestras contienen niveles comparables de patrón interno (indicados por la flecha horizontal). La sangre contiene hemoglobina y otros inhibidores de la Taq polimerasa no específicos (utilizados en la amplificación por PCR de los productos de la telomerasa), como se indica por la pérdida del patrón interno en las calles a la izquierda del gel. Sin embargo, estos inhibidores no específicos pueden diluirse por diluciones en serie (cantidades decrecientes de lisado de tumor en la mezcla de reacción). A la concentración más baja de lisado de tumor (las tres calles de la derecha), a la que el patrón interno es comparable en las tres condiciones de tratamiento, está claro que el compuesto C inhibió la actividad telomerasa en mayor medida que una dosis comparable del compuesto A.

Ejemplo 5 Reducción de los niveles de proteína de mieloma en modelos animales

El plasma de pacientes con mieloma contiene un alto nivel característico (detectado como un "pico de mieloma" o proteína M) del anticuerpo producido por las células cancerosas. La reducción del nivel de proteína M es correlativa con la remisión de la enfermedad. En este experimento, se compararon las capacidades del compuesto oligonucleotídico no conjugado A y del compuesto oligonucleotídico conjugado con lípido C para reducir el nivel de proteína M en animales inyectados con células de mieloma. Se inyectaron ratones NOD/SCID irradiados con 10⁶ células de mieloma CAG y después se trataron con inyecciones intraperitoneales (IP) de PBS, Compuesto A en PBS o Compuesto C en PBS. El compuesto A se dosificó a 25 mg/kg/día (175 mg/kg semana x 5 semanas); el compuesto C se dosificó a 25 mg/kg/día durante las primeras 2 semanas, se mantuvo durante la tercera semana y después se dosificó a 25 mg/kg/día tres días por semana durante las últimas dos semanas (dosis promedio de 100 mg/kg/semana durante las cinco semanas). Al final del tratamiento (35 días después de la inoculación) los ratones se sacrificaron y el plasma se agrupó dentro de cada grupo (4 - 5 ratones/grupo) para la determinación de la proteína de mieloma. Como se muestra en la Figura 6, a pesar de una dosis de compuesto C un 40 % menor (dosis acumulativa de 500 mg frente a 875 mg para el compuesto A), el grupo del compuesto C demostró un nivel menor de proteína de mieloma (valores normalizados por ratón).

Ejemplo 6 Inhibición del crecimiento de tumores humanos en modelos animales

Las capacidades del compuesto oligonucleotídico no conjugado A y del compuesto oligonucleotídico conjugado con lípido C para inhibir el crecimiento de tumores humanos en animales se compararon en el siguiente experimento. Se inocularon ratones NOD/SCID irradiados por vía subcutánea con células CAG de mieloma y después de 14 días de crecimiento tumoral se trataron con inyecciones IP de PBS, Compuesto A (25 mg/kg/día L - V o 125 mg/kg/semana) o compuesto C (25 mg/kg L - V o 75 mg/kg/semana). Como se muestra en la Figura 7, a pesar de tener una dosis un 40 % menor, el compuesto C demostró mayor eficacia antitumoral que el compuesto A. (En este estudio, el compuesto A se administró a una dosis un 30 % menor que la que se había asociado anteriormente a la eficacia antitumoral en este modelo, 175 mg/kg/semana).

Como parte de este estudio, los tumores de mieloma CAG del flanco se extirparon después del sacrificio y se analizaron para determinar la actividad telomerasa (mediante ensayo TRAP) y la longitud de TRF por transferencia Southern. Como se muestra en la Figura 8, a pesar de administrarse a una dosis un 40 % más baja, el compuesto C demostró una inhibición sustancialmente mayor de la actividad telomerasa (reducción del 83 %) y la inducción del acortamiento de los telómeros en las células tumorales (TRF medio de 2,85 Kb). La dosis más alta del compuesto A produjo una inhibición de la telomerasa menor (41 %) y no dio como resultado un acortamiento significativo de los telómeros durante el transcurso de tiempo del estudio.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Geron Corporación Gryaznov, Sergei Pongracz, Krisztina

<120> Oligonucleótidos modificados para la inhibición de la telomerasa

<130> 387978011WO0

5 <140> PCT/US 04/29718
<141> 09-09-2004

<150> US 60/501.509
<151> 09-09-2003

10 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 451
<212> ARN
<213> Homo sapiens

20 <400> 1

```

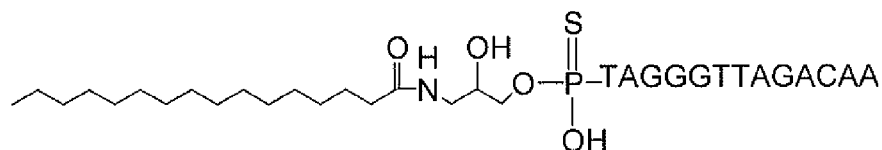
ggguugcgga gggugggccu gggaggggug guggccauuu uuugucuaac ccuaacugag      60
aagggcguag gcgccgugcu uuugcucucc gcgcguguu uuucucgcug acuuucagcg      120
ggcggaaaag ccucggccug ccgccuucca ccguucauuc uagagcaaac aaaaauguc      180
agcugcuggc ccguucgccc cucccgggga ccugcggcgg gucgccugcc cagccccga      240
accccgccug gaggccgcgg ucggcccggg gcuucuccgg aggcaccac ugccaccgcg      300
aagaguuggg cucugucagc cgcgggucuc ucgggggcga gggcgagguu caggccuuuc      360
aggccgcagg aagaggaacg gagcgagucc ccgcgcgcgg cgcgauucc ugagcugugg      420
gacgugcacc caggacucgg cucacacaug c                                     451

```

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura:

5

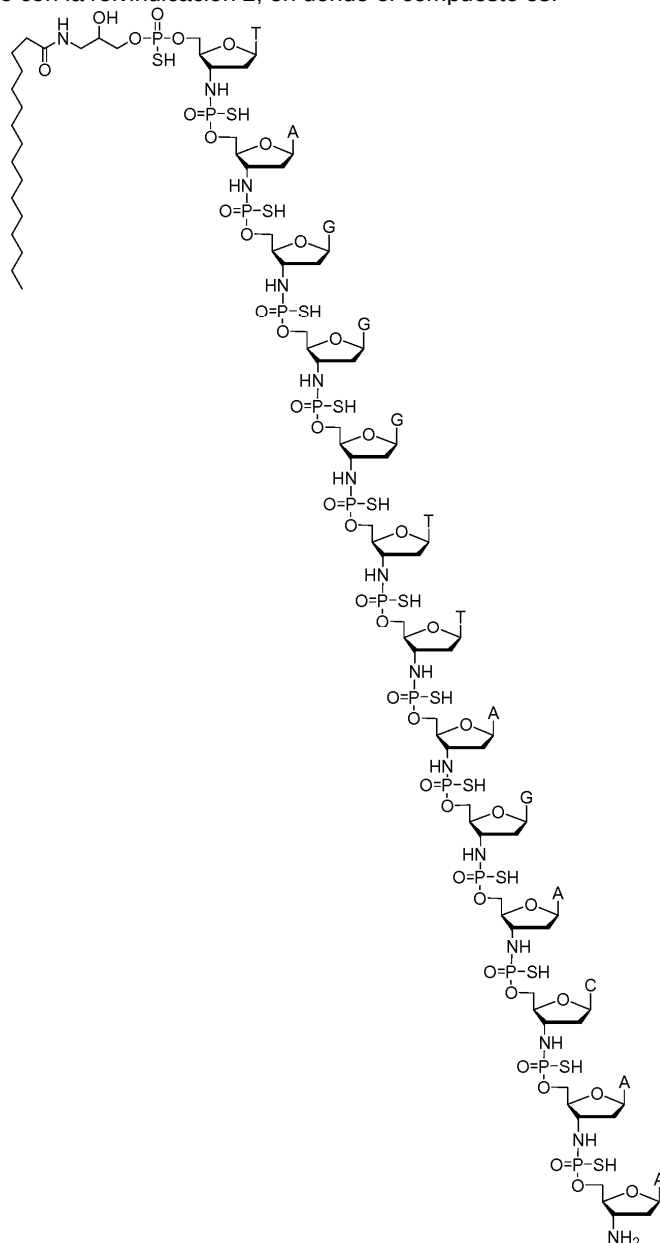


en la que los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido comprenden al menos un enlace tiofosforamidato N3' → P5';
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

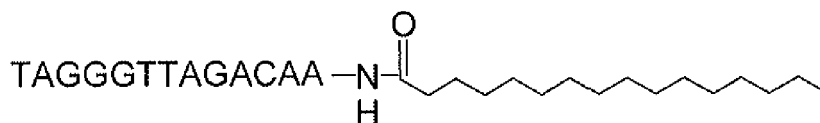
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido son enlaces tiofosforamidato N3' → P5';
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el compuesto es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto que tiene la estructura:



en la que los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido comprenden al menos un enlace tiofosforamitato N3' → P5';
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido son enlaces tiofosforamidato N3' $\rightarrow$ P5';
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la sal es una sal de sodio.

7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el compuesto es una sal de sodio.

8. Un método *in vitro* de inhibición de la actividad de una enzima telomerasa, comprendiendo el método poner en contacto la enzima telomerasa con un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un método *in vitro* de inhibición de la actividad de la enzima telomerasa en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

10. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la célula es una célula cancerosa.

11. Un método *in vitro* de inhibición de la proliferación de una célula cancerosa, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

12. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en medicina.

13. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento del cáncer.

14. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el cáncer es un tumor hemático.

15. El uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

16. Uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el cáncer es un tumor hemático.

17. Uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de una célula cancerosa.

18. Uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad de una enzima telomerasa.

19. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

20. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 formulada en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

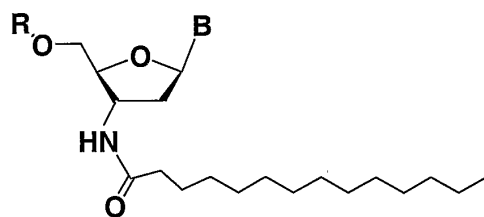
21. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 19 o 20, que comprende adicionalmente otro agente quimioterápico.

22. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para su uso en medicina.

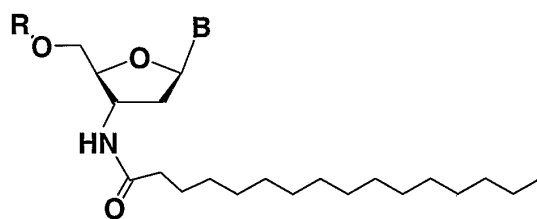
23. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para su uso en el tratamiento del cáncer.

24. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el cáncer es un tumor hemático.
- 5 25. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en medicina junto con radioterapia.
26. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en medicina junto con otro agente quimioterápico.
- 10 27. Uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 junto con otro agente quimioterápico en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.
28. Uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el cáncer es un tumor hemático.

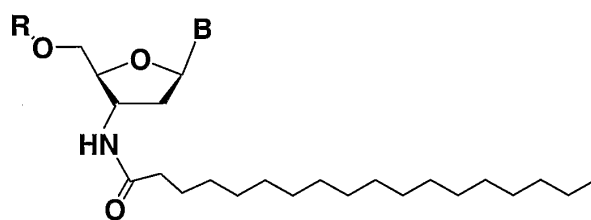
FIGURA 1



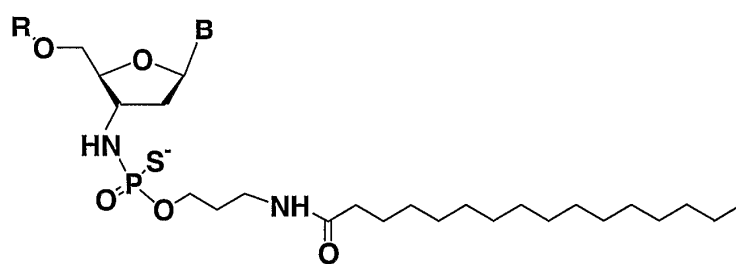
1A



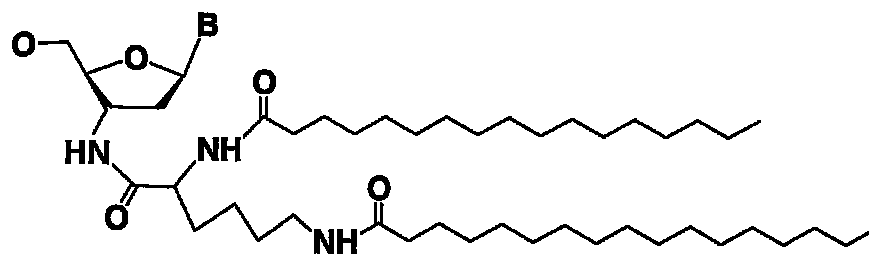
1B



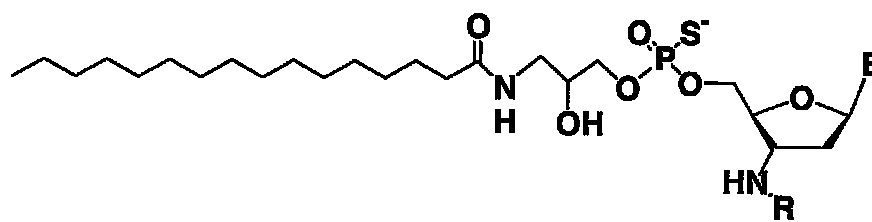
1C



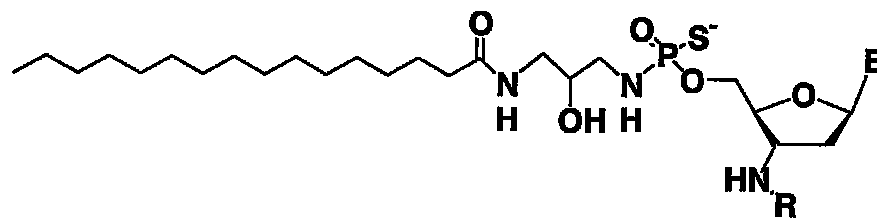
1D



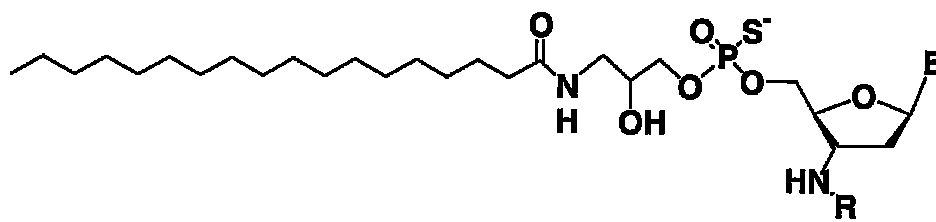
1E



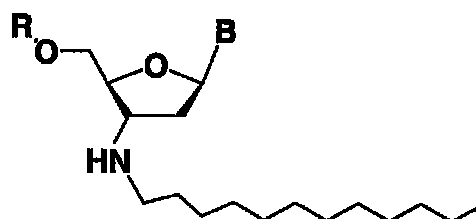
1F



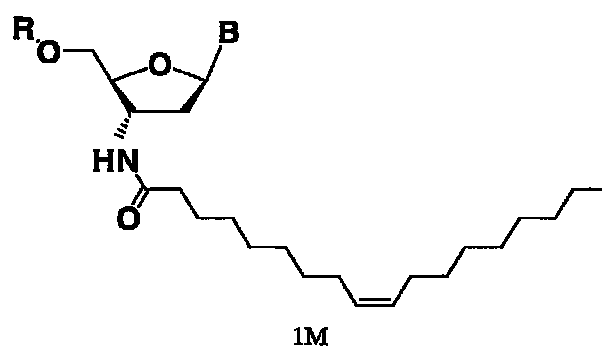
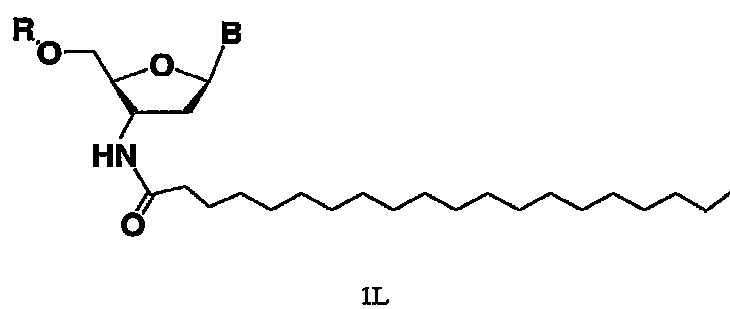
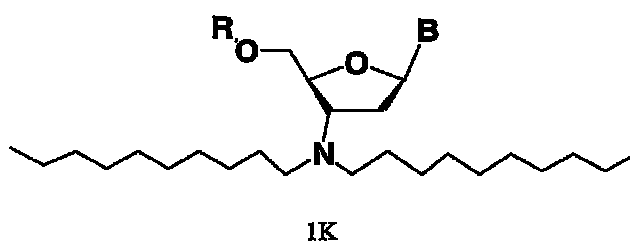
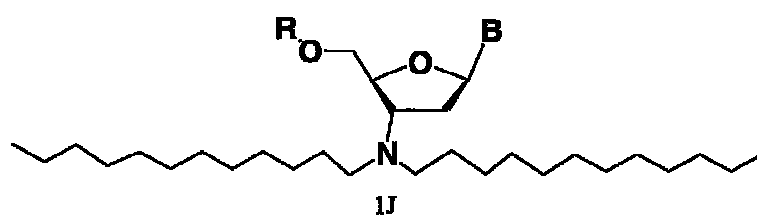
1G

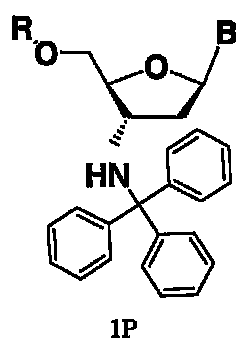
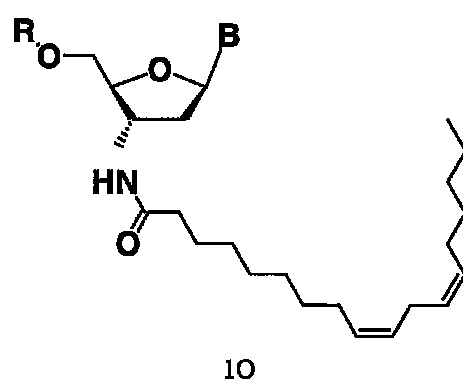
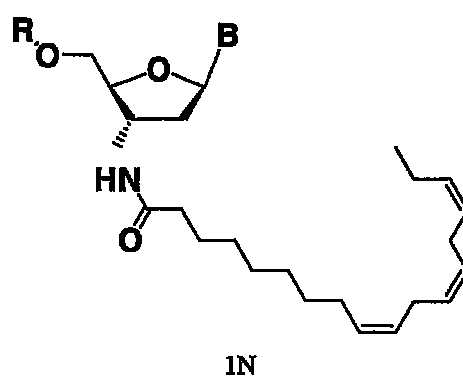


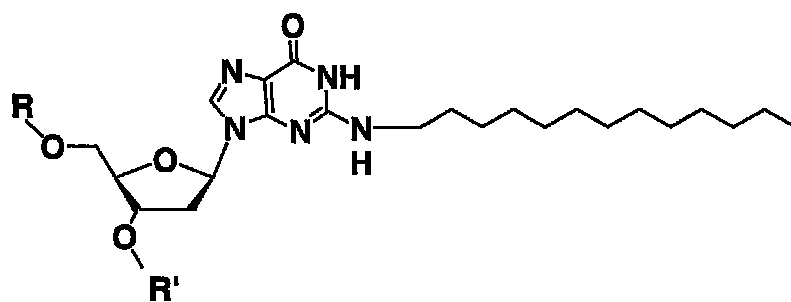
1H



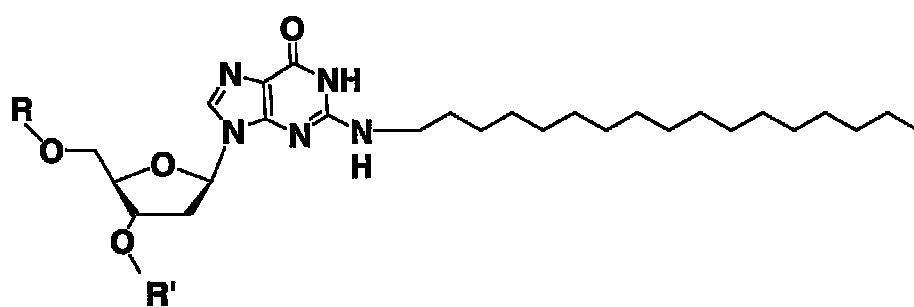
1I



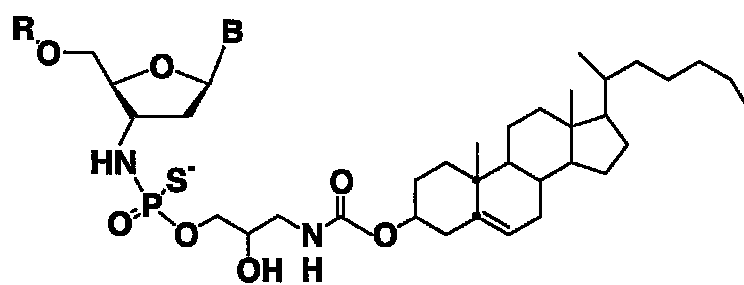




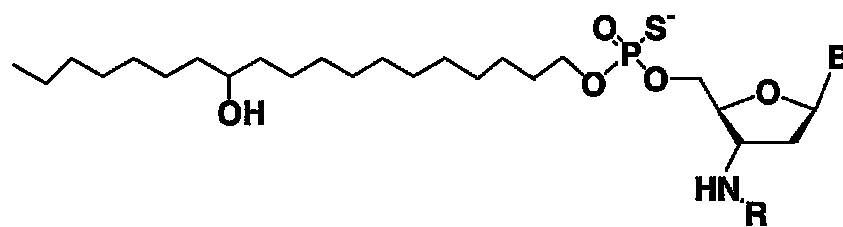
1Q



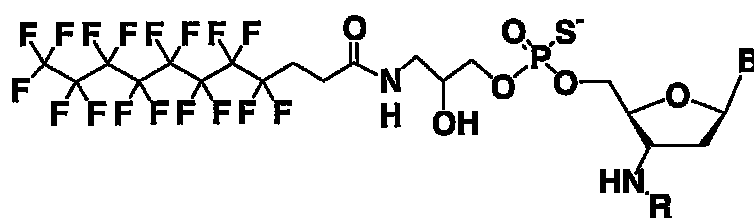
1R



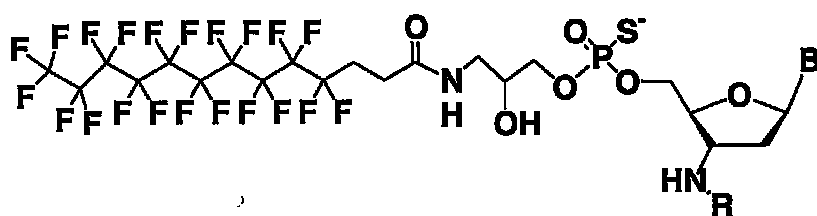
1S



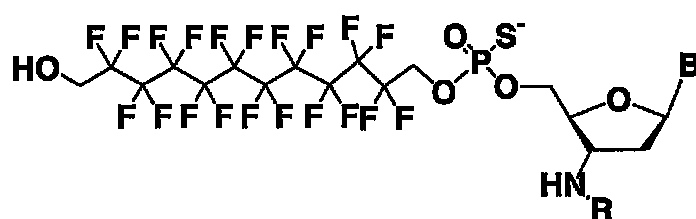
1T



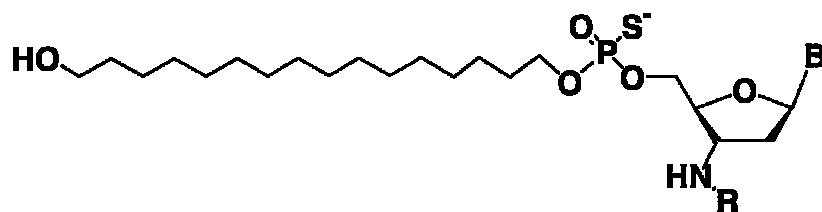
1U



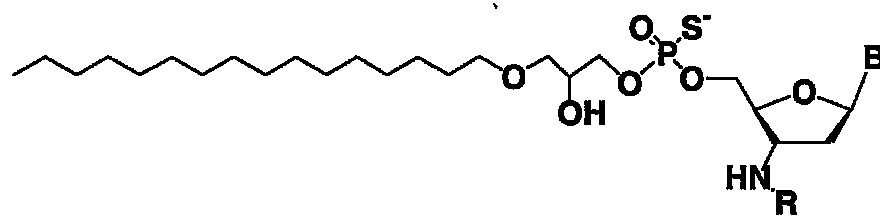
1V



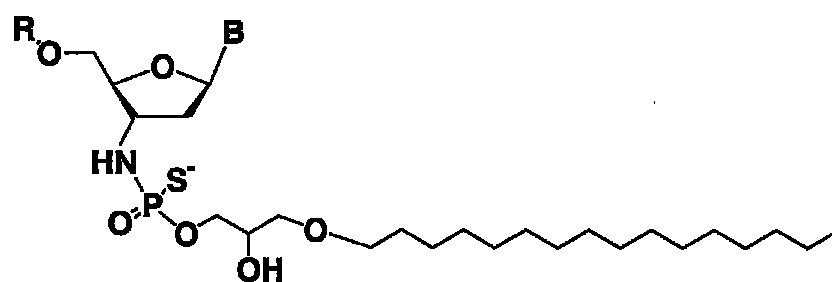
1W



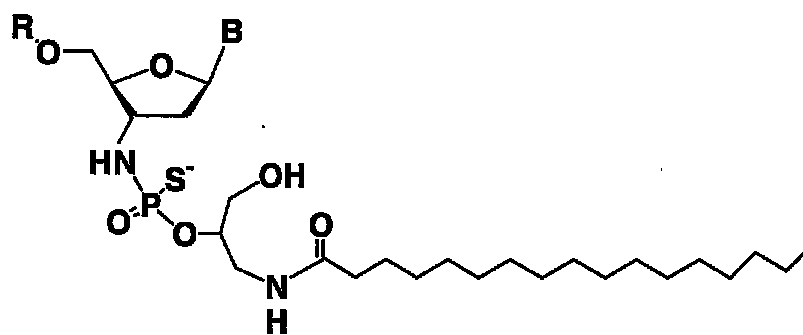
1X



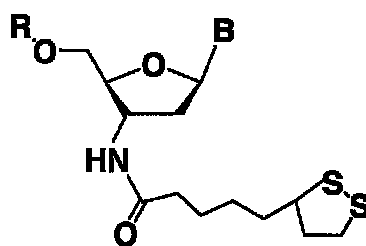
1Y



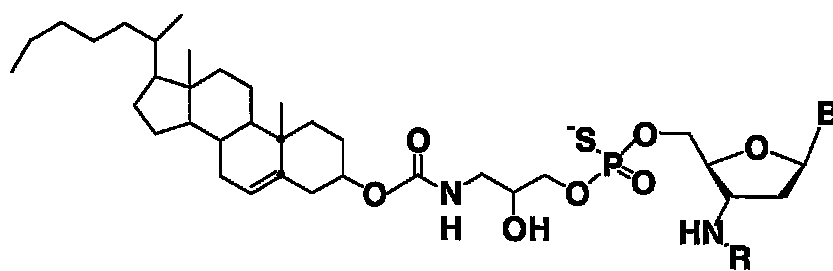
1Z



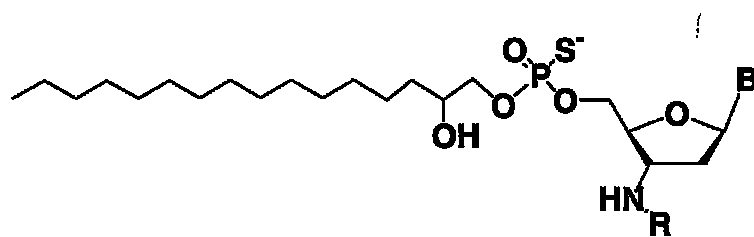
1AA



1BB



1CC



1DD

FIGURA 2

FIG. 2A

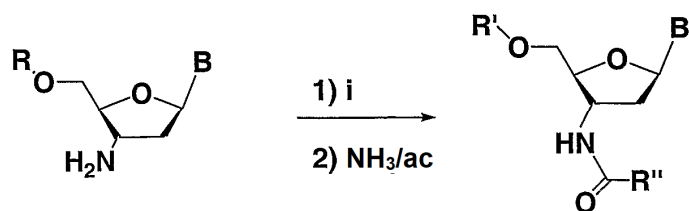


FIG. 2B

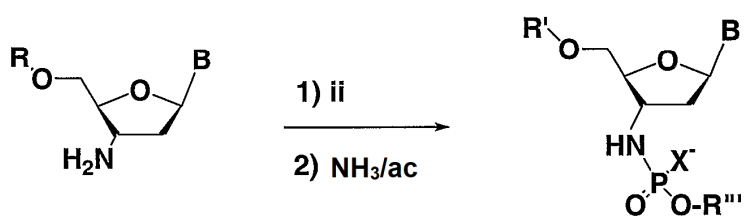


FIG. 2C

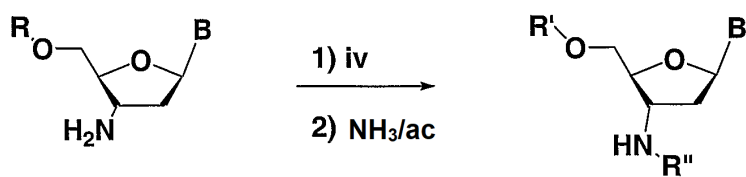


FIG. 2D

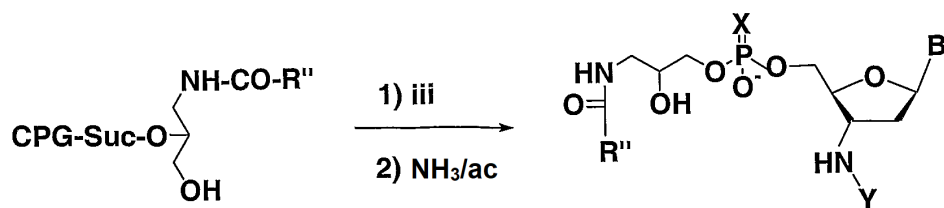


FIG. 2E

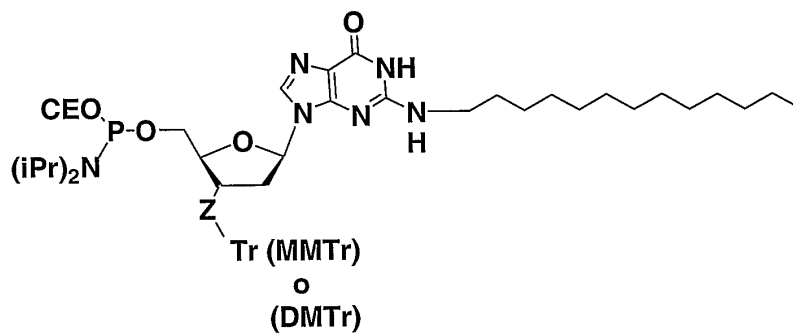


FIG. 3.

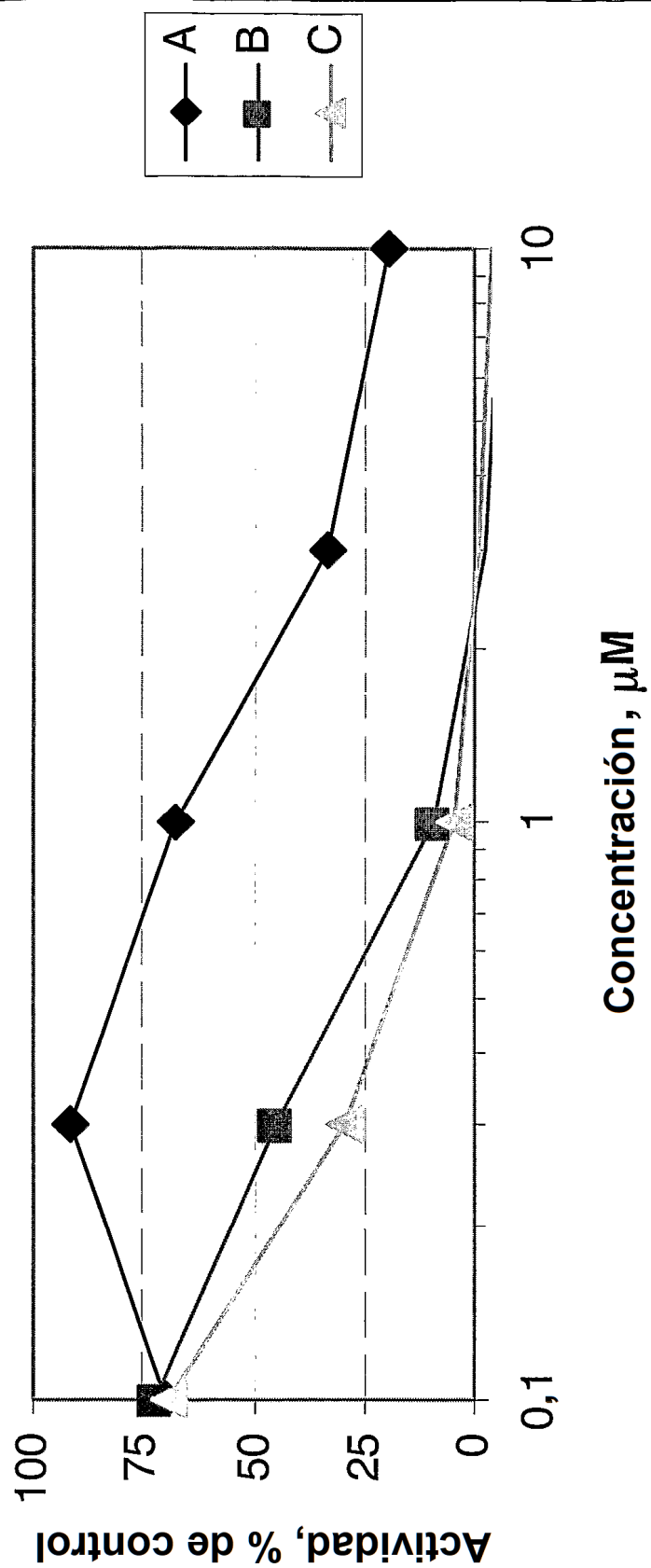


FIG. 4

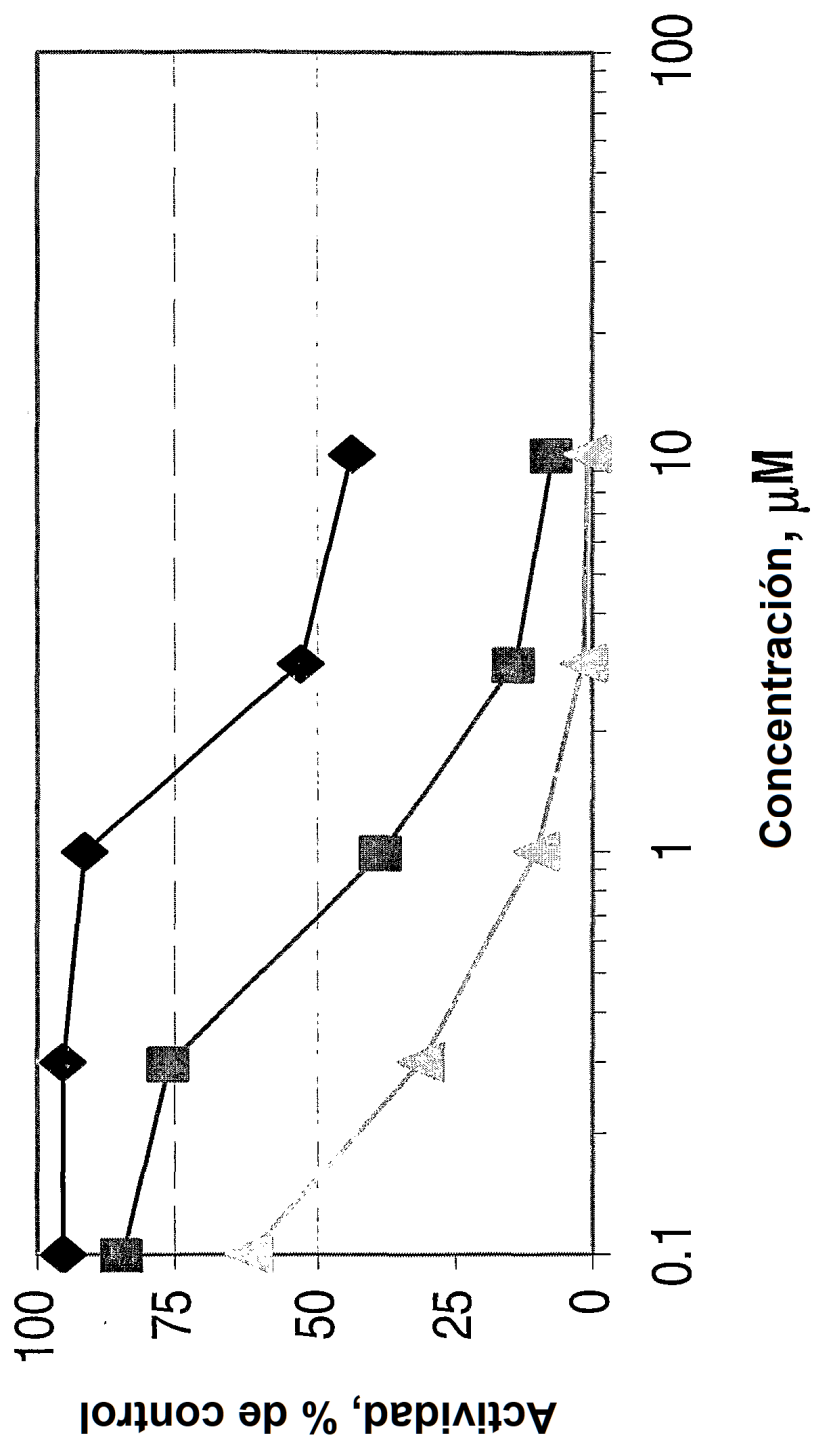


FIG. 5

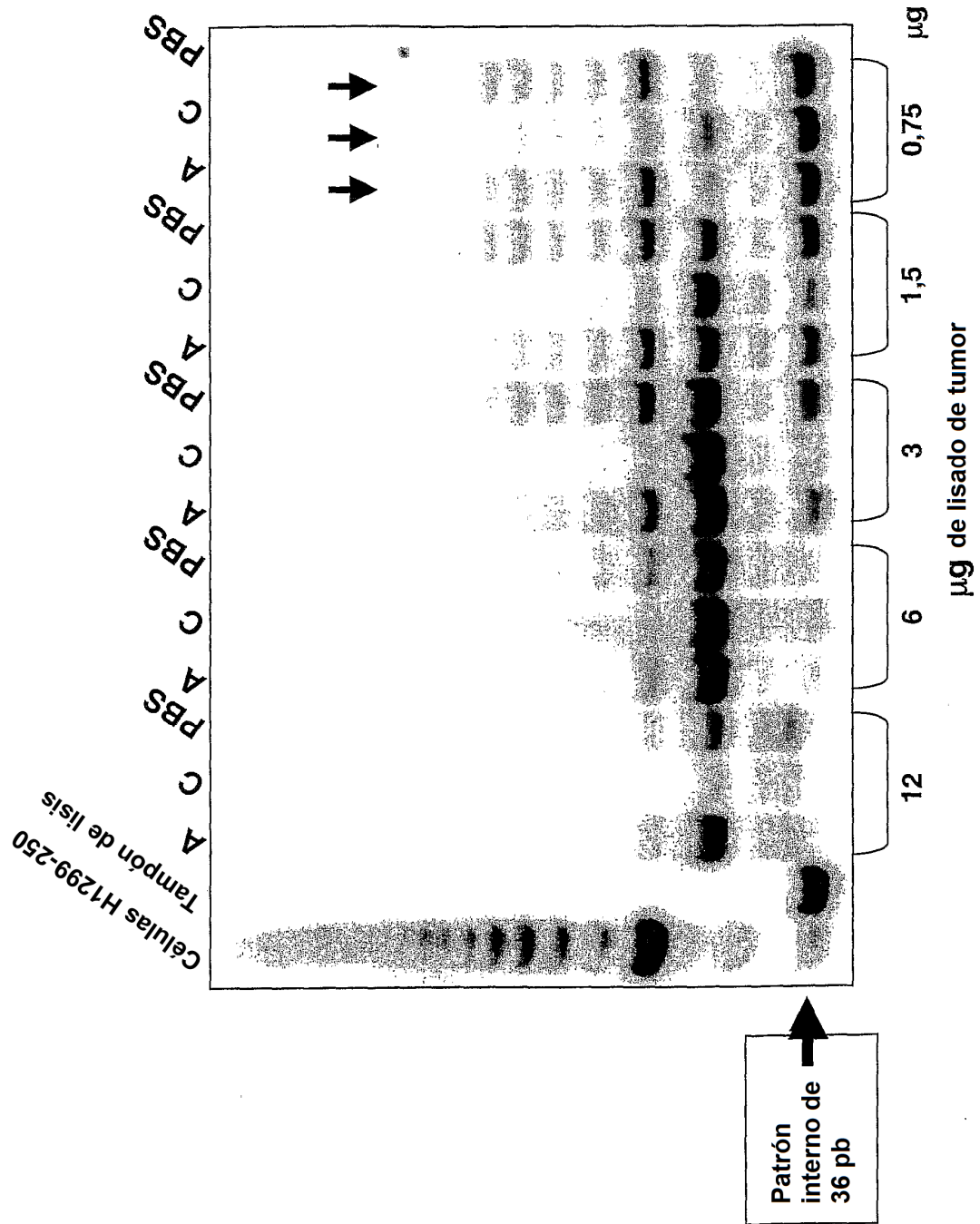


FIG. 6

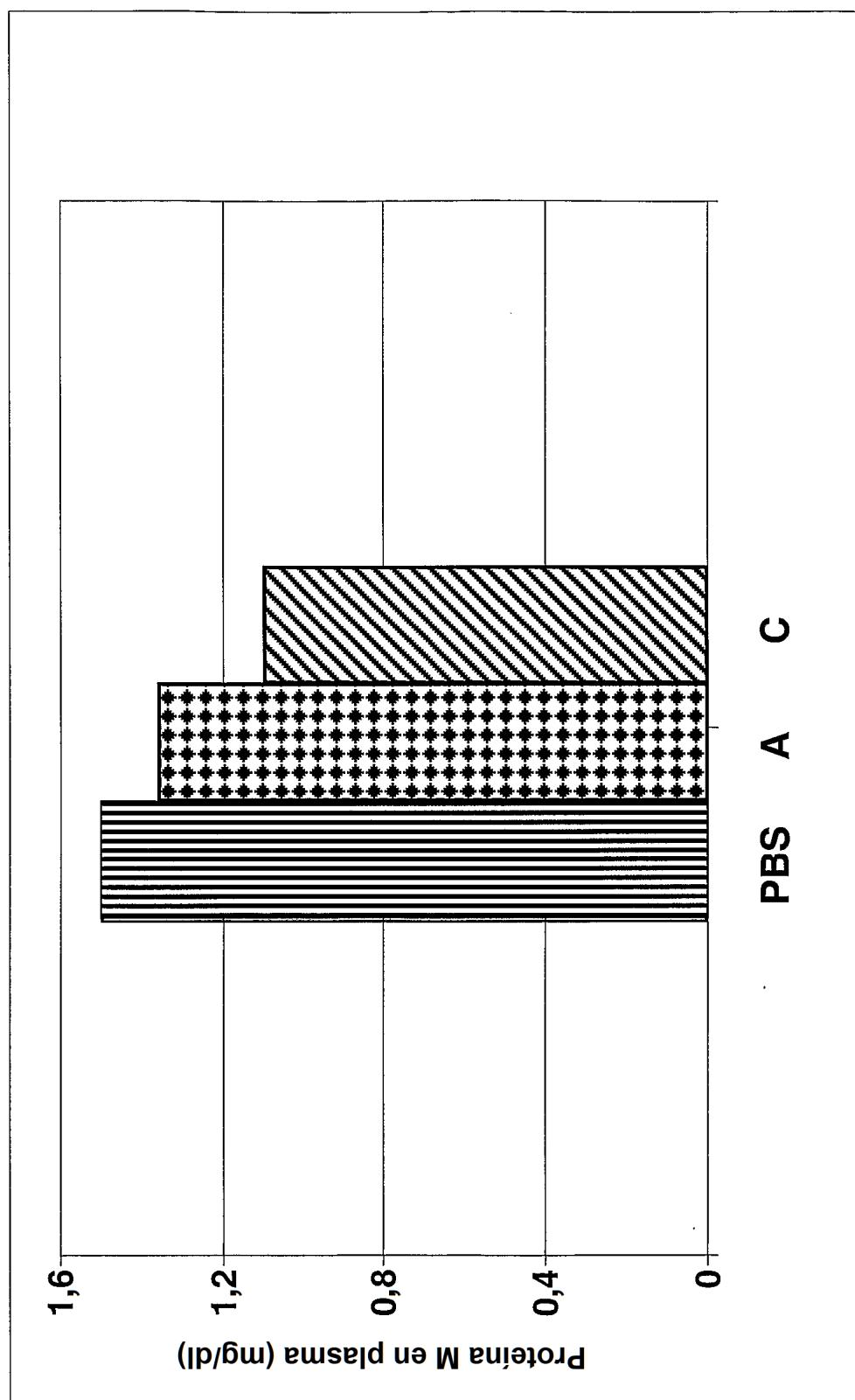


FIG. 7

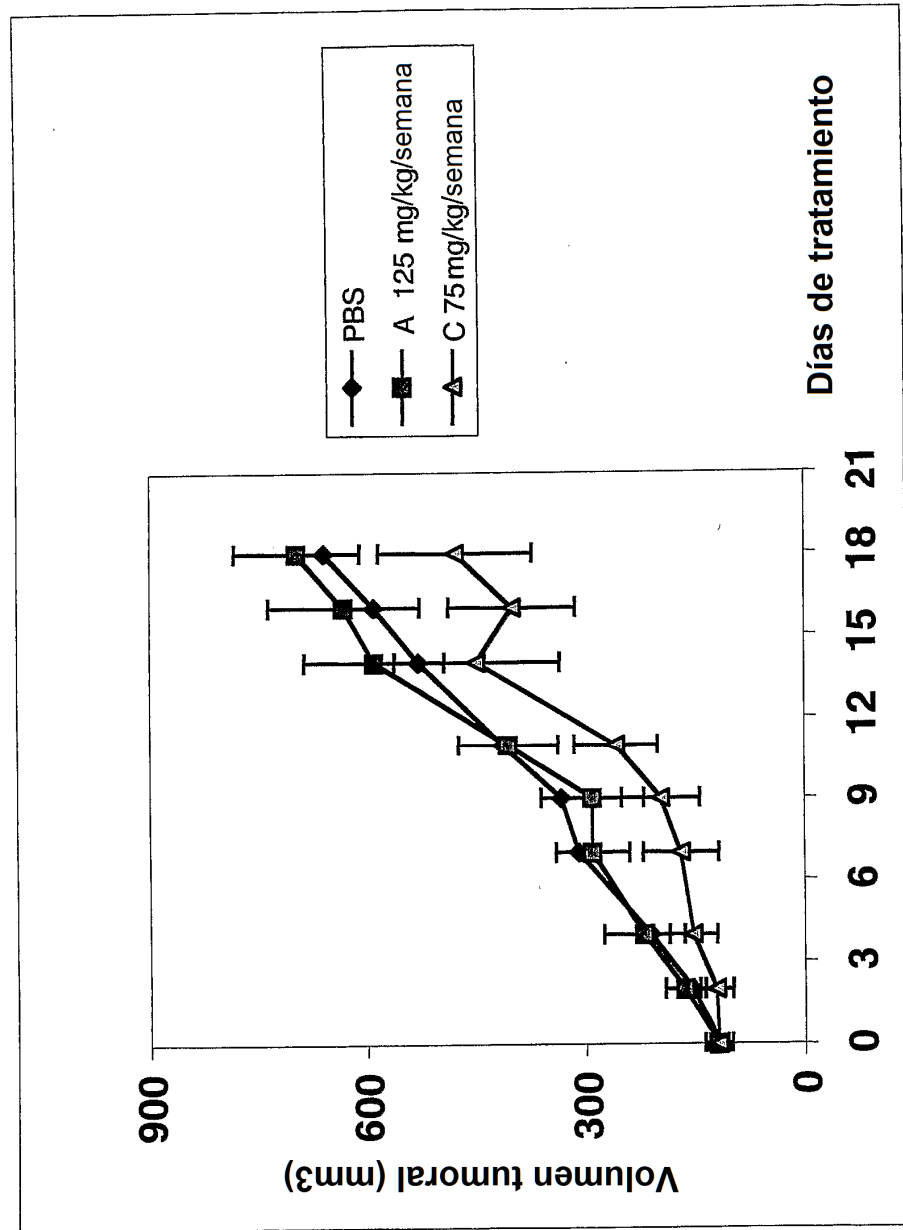


FIG. 8

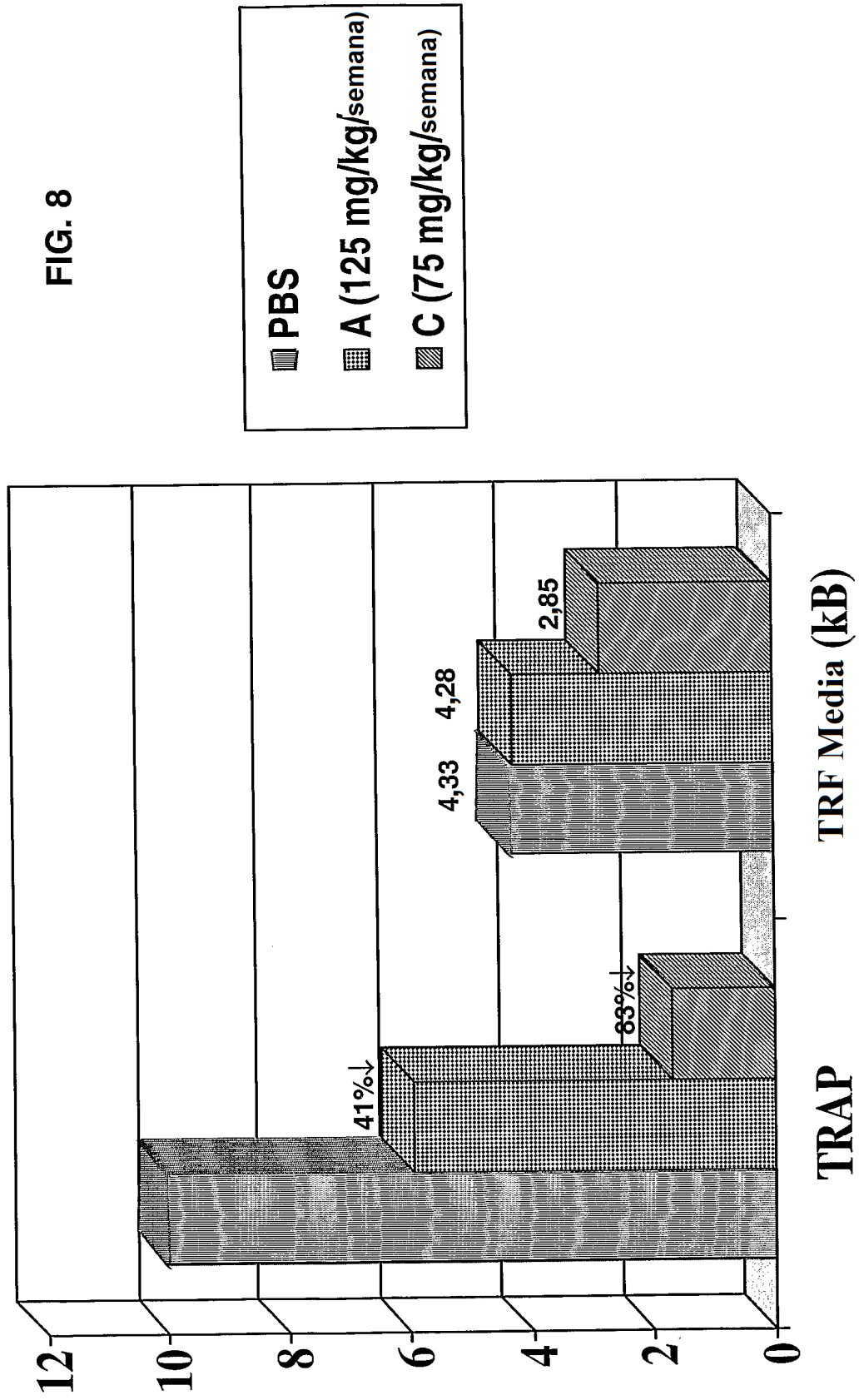


FIGURA 9

TAGGGTTAGACAA

Fig. 9A

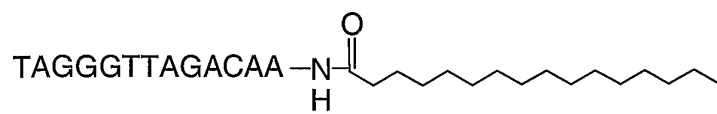


Fig. 9B

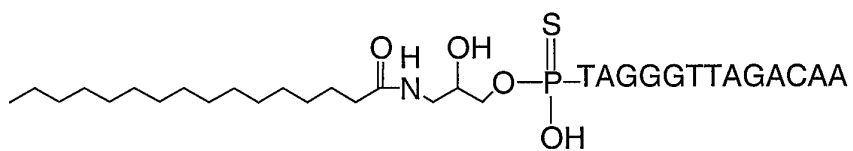


Fig. 9C