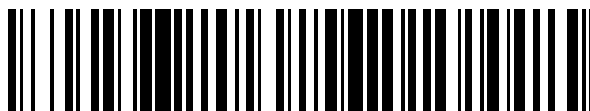


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 209**

51 Int. Cl.:

C07K 14/495 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/EP2014/055195**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14713401 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2970419**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361790488 P

17.07.2013 US 201361847287 P

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

20.06.2018

73 Titular/es:

**NOGRA PHARMA LIMITED (100.0%)
33 Sir John Rogerson's Quay
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

**MONTELEONE, GIOVANNI;
BELLINIA, SALVATORE y
FRANCESCA, VITI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 673 209 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

Procedimientos de tratamiento del cáncer colorrectal

Campo de la invención

5 La presente invención se dirige generalmente a procedimientos de tratamiento y/o prevención del cáncer colorrectal y crecimiento de células de cáncer colorrectal a través de la administración de inhibidores de SMAD7, particularmente oligonucleótidos antisentido dirigidos contra SMAD7, así como composiciones farmacéuticas que contienen inhibidores de SMAD7 para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal.

Antecedentes

10 El cáncer colorrectal es una enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada de células del intestino grueso, incluyendo células del colon o del recto. Se cree que los tumores de cáncer colorrectal se originan en la mucosa normal. La tumorigénesis está asociada con la aparición de grupos de criptas ampliadas que muestran anomalías proliferativas y bioquímicas. La proliferación de las células epiteliales que llevan la mutación o mutaciones causantes puede convertirse en tumores en etapa temprana caracterizados por displasia de alto grado. El crecimiento adicional puede dar como resultado crecimiento invasivo en las capas musculares y a través de la pared intestinal. Si no se trata, estos tumores pueden diseminarse a los ganglios linfáticos regionales y, luego, producir metástasis en sitios distantes, punto en el que se vuelven en gran parte no tratables con las tecnologías actualmente disponibles (Markowitz y Bertagnolli (2009) N. Engl. J. Med. 361(25): 2449-2460). Si bien los tumores pueden aparecer *de novo*, la evidencia indica que aproximadamente el 60 % de los carcinomas se originan a partir de adenomas preexistentes (Soreide y col., (2011) Discov. Med. 12(66):393-404). Por lo tanto, la gran mayoría de tumores de cáncer colorrectal se pueden clasificar como adenocarcinomas, pero también se observan linfomas y carcinomas de células escamosas en un subconjunto más pequeño de casos. Las mutaciones genéticas que dan como resultado carcinogénesis incluyen mutaciones en miembros de la vía de señalización Wnt, miembros de la ruta de señalización de células TGF- β tales como miembros de la familia SMAD y TGF- β 1, proteínas que regulan el equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular tales como TP53 y otras proteínas tales como DCC (Reya y Clevers (2005) Nature 434(7035):843-850; Baker y col., (1989) Science 244:217-221; Markowitz y Bertagnolli, anteriormente citado). La activación anormal de PI3K/Akt y la señalización de mTOR corriente abajo se asocian con tumorigénesis de cáncer colorrectal (Rychahou y col., (2006) Ann. Surg. 243(6):833-842). También se han observado altos niveles de expresión de EGFR en líneas celulares de cáncer de colon y se correlacionan con la progresión del tumor de cáncer colorrectal (Ciardiello y col., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88(17):7792-7796). Más allá de factores familiares y genéticos, los factores de riesgo para el cáncer colorrectal pueden incluir niveles bajos de actividad física, consumo de alcohol, alto consumo dietético de grasa y carne y bajo consumo de fibra y vegetales. Los síntomas del cáncer colorrectal generalmente incluyen hemorragia rectal, anemia, estreñimiento, sangre en el excremento, pérdida de peso, fiebre, pérdida de apetito y náuseas o vómitos.

35 El cáncer colorrectal es la segunda forma de cáncer más común entre hombres y mujeres estadounidenses supervivientes de cáncer (Siegel y col., (2012) CA Cancer J. Clin. 62(4):220-41). Además, el cáncer colorrectal está entre las tres causas más comunes de muerte por cáncer en el mundo occidental (Soreide y col., (2011) Discov. Med. 12(66):393-404). La adaptación más reciente de muchos países asiáticos a un estilo de vida occidental también da como resultado un significativo aumento en cáncer colorrectal en esas poblaciones (Yang y col., (2011) Dig. Surg. 28(5-6):379-385). En 2012, se estima que había 1,2 millones de individuos en los Estados Unidos que vivían con un diagnóstico previo de cáncer colorrectal. Para el mismo año, se predijo que se diagnosticarían 143.460 adicionales con la enfermedad. La edad media al momento del diagnóstico del cáncer colorrectal es 68 años para los hombres y 72 años para las mujeres (Howlader y col., (2011) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008. Bethesda, MD: National Cancer Institute). Si bien la incidencia de cáncer colorrectal no es rara en adultos de edad avanzada, solo el 59,1 % de las personas mayores de 50 años reciben exámenes de cáncer colorrectal de acuerdo con las pautas (American Cancer Society (2012) Cancer Prevention & Early Detection Facts & Figures. Atlanta, GA: American Cancer Society). Esta falta de detección temprana de como resultado que solo el 39 % de pacientes sean diagnosticados cuando el cáncer no ha progresado más allá de una etapa local (Howlader y col., menciona anteriormente). Dado el aumento del número de pacientes que padecen de cáncer colorrectal, existe una necesidad de desarrollar procedimientos de tratamiento sólidos, especialmente para el gran número de pacientes que no se identifican mediante exámenes tempranos.

Li y col. (Cancer Letters 335 (2013) 168-174) describe un estudio que analiza la expresión del microARN miR-25 endógeno en tejido tumoral de cáncer de colon, los efectos *in vitro* de la expresión de miR-25 en la línea celular de cáncer de colon HCT116 y la expresión de SMAD7 en células HCT116.

55 El documento WO2004087920 describe la utilización de oligonucleótidos antisentido contra Smad7 en el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria crónica.

Sumario

En un aspecto la presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso en un procedimiento del tratamiento del cáncer colorrectal en un paciente como se expone en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal, que comprende un oligonucleótido antisentido SMAD7 de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se expone en las reivindicaciones.

5 La presente divulgación describe procedimientos novedosos para el tratamiento del cáncer colorrectal a través de la inhibición de SMAD7, potenciando el papel de SMAD7 como un antagonista clave en la ruta de señalización de TGF- β . Si bien se ha propuesto otros objetivos potenciales para la intervención terapéutica en cáncer colorrectal, la presente invención proporciona un nuevo tratamiento que se muestra para prevenir, retardar, detener o revertir el crecimiento de células tumorales colorrectales.

10 La presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento del cáncer colorrectal mediante la inhibición de SMAD7. Específicamente, la divulgación describe un procedimiento de inhibición de SMAD7 en un tumor colorrectal en un paciente. La divulgación también proporciona un procedimiento de inhibición del crecimiento de células de cáncer colorrectal mediante la inhibición de SMAD7. La divulgación también proporciona un procedimiento para inhibir SMAD7, tratar cáncer colorrectal y/o inhibir el crecimiento de células de cáncer colorrectal a través de la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de SMAD7. Por ejemplo, inhibidores de SMAD7 (por ejemplo, terapias antisentido antiSMAD7, es decir, oligonucleótido antisentido contra SMAD7 y anticuerpos contra SMAD7). "Oligonucleótido antisentido", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligonucleótidos sintética corta complementaria al ARN mensajero (ARNm), que codifica para la proteína diana (por ejemplo, SMAD7). Las secuencias de oligonucleótidos antisentido se hibridan con el ARNm produciendo un híbrido de doble cadena que puede conducir a la activación de enzimas catalíticas ubicuas, tales como RNasa H, que degrada cadenas híbridas de ADN/ARN evitando así la traducción de proteínas.

15 Un inhibidor de SMAD7 puede ser un inhibidor específico de SMAD7 tal como un oligonucleótido antisentido o cualquier otro medio para dirigirse a SMAD7 con un alto grado de especificidad. Puede seleccionarse un inhibidor de oligonucleótidos antisentido de SMAD7 de, aunque sin limitación, el grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 25 12, descritas en el presente documento. Por ejemplo, un inhibidor de oligonucleótidos antisentido SMAD7 puede incluir la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 9 o puede incluir la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 10. Un oligonucleótido antisentido SMAD7 ejemplar de la presente invención es la secuencia representada por una forma de SEQ ID NO: 6, en la que todos los enlaces fosfato son enlaces fosforotioato (SEQ ID NO: 10, denominada en el presente documento GED-0301).

30 "Inhibidor", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente capaz de disminuir la expresión de un gen o secuencia de ADN, evitar o suprimir la producción, actividad o traducción de un producto de ARN de un gen en proteína o evitar o suprimir la actividad del producto proteico de un gen, a través de una interacción directa o indirecta con el gen, producto de ARN o producto proteico de un gen o cualquier forma transitoria de estas entidades u otra entidad molecular cuya actividad o expresión afecta en la actividad o expresión de la diana prevista.. Dichos inhibidores pueden incluir, aunque sin limitación, por ejemplo, anticuerpos, moléculas pequeñas que se unen a una diana molecular específica y oligonucleótidos antisentido dirigidos a transcritos de ARNm específicos. Por consiguiente, "inhibidor de SMAD7", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente capaz de disminuir la expresión de SMAD7, evitar o suprimir la producción, actividad o traducción de un producto de ARN de SMAD7 en proteína o evitar o suprimir la actividad del producto proteico de SMAD7, a través de una interacción 40 directa o indirecta con el gen, producto de ARN o producto proteico de SMAD7 o cualquier forma transitoria de estas entidades u otra entidad molecular cuya actividad o expresión afecta en la actividad o expresión de SMAD7.

45 La presente divulgación también describe procedimientos de tratamiento del cáncer colorrectal a través de la administración de inhibidores específicos de SMAD7. Un "inhibidor específico", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que tiene propiedades estructurales y/o funcionales que le permiten actuar de forma exclusiva o con un alto grado de selectividad en una diana molecular. Por lo tanto, un inhibidor específico de SMAD7 posee la propiedad funcional inherente de dirigirse al gen SMAD7, sus productos de ARN o proteicos u otra entidad molecular cuya actividad o expresión afecta en la actividad o expresión de SMAD7 o sus productos, ya sea exclusivamente o con alto grado de especificidad. En el caso de inhibidores de anticuerpos de SMAD7, la especificidad se puede diseñar mediante ingeniería genética en el anticuerpo a través de la inclusión de secuencias de proteínas que se sabe que se unen a epítopos de proteína SMAD7 con un alto grado de especificidad. En el caso de inhibidores de molécula pequeña de SMAD7, se pueden incluir grupos químicos en la formulación de la molécula pequeña que permite la unión a características específicas de la proteína SMAD7. Se pueden diseñar oligonucleótidos antisentido de manera que la porción diana de la secuencia de nucleótidos incorporada a cada oligonucleótido antisentido es completamente o casi completamente complementaria a la secuencia de ARNm de SMAD7. La incorporación de dicha secuencia de nucleótidos complementaria o casi complementaria permite diseñar mediante ingeniería genética de oligonucleótidos antisentido con un alto grado de especificidad para una diana dada. La especificidad se puede evaluar a través de la medición de parámetros tales como la constante de disociación u otros criterios tales como cambios en niveles de expresión de proteínas o ARN u otros ensayos que miden la actividad o expresión de SMAD7.

60 Los inhibidores de SMAD7 específicos pueden incluir, por ejemplo, pequeñas moléculas de unión, por ejemplo, compuestos naturales y sintéticos, anticuerpos, aptámeros, intrámeros, ARNi (ARN bicatenario, ARNip) y moléculas

antisentido antiSMAD7 para el tratamiento del cáncer colorrectal y/o inhibición del crecimiento celular en cáncer colorrectal. Los inhibidores de SMAD7 también pueden comprender moléculas de SMAD7 truncadas y/o mutadas que interfieren con la actividad, asociaciones de unión o sustratos de SMAD7 y que, por lo tanto, inhiben la función de SMAD7.

- 5 "Cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un agente que es suficiente para tratar, al menos parcialmente, una afección cuando se administra a un paciente. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo de la afección, la ruta de administración del componente y la edad, el peso, etc. del paciente a ser tratado. Por consiguiente, una cantidad eficaz de un inhibidor específico de SMAD7 es la cantidad de inhibidor necesaria para tratar el cáncer colorrectal en un paciente de tal manera que la administración del agente evita que se produzca el cáncer colorrectal en un sujeto, evita la progresión del cáncer colorrectal (por ejemplo, evita el inicio de eventos tales como tumorigénesis, crecimiento tumoral o metástasis) o mitiga o alivia completamente todos los síntomas asociados al cáncer colorrectal, es decir, causa regresión de la enfermedad.

10 La presente divulgación también describe un procedimiento para el tratamiento del cáncer colorrectal a través de la administración de una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido contra SMAD7. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal como se expone en las reivindicaciones. La composición farmacéutica comprende un inhibidor de SMAD7, que comprende un oligonucleótido antisentido que se dirige a SMAD7 como se expone en las reivindicaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento la expresión "composición farmacéutica" significa, por ejemplo, una mezcla que contiene una cantidad específica de un compuesto terapéutico, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz, de un compuesto terapéutico en un vehículo farmacéuticamente aceptable para ser administrado a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, a fin de tratar el cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden un oligonucleótido antisentido contemplado contra SMAD7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la divulgación describe la utilización de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer colorrectal. "Medicamento", como se usa en el presente documento, tiene, esencialmente, el mismo significado que la expresión "composición farmacéutica".

20 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa tampones, vehículos y excipientes adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. El vehículo(s) debería ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de las fórmulas y no perjudicial para el receptor. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen tampones, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conocen en la materia. En una realización, la composición farmacéutica es para administración oral e incluye un revestimiento entérico adecuado para regular el sitio de absorción de las sustancias encapsuladas dentro del sistema digestivo o intestino. Por ejemplo, un revestimiento entérico puede incluir un copolímero de etilacrilato-ácido metacrílico.

30 En una realización, un oligonucleótido antisentido contemplado contra SMAD7 y cualquier composición farmacéutica del mismo puede ser para administración mediante una o varias rutas, incluyendo oral, tópica, parenteral, *por ejemplo*, inyección subcutánea, mediante pulverizador de inhalación o vía rectal. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, administración intrapancreática, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inyección intraesternal, o técnicas de infusión. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido contra SMAD7 puede ser para administración subcutánea a un sujeto. En otro ejemplo, el oligonucleótido antisentido contra SMAD7 puede ser para administración oral a un sujeto. En otro ejemplo, el oligonucleótido antisentido contra SMAD7 puede ser para administración directa a un tumor colorrectal o a células de cáncer colorrectal a través de administración parenteral.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 (A) muestra el control del isotipo IgG (isotipo, panel izquierdo) e inmunotinción de SMAD7 en áreas no tumorales (NT) y tumorales (T) (paneles central y derecho respectivamente) de un paciente con cáncer colorrectal esporádico; la figura 1 (B) es una transferencia de Western que muestra niveles de SMAD7 y β -actina en tejido no tumoral y tumoral de dos pacientes con cáncer colorrectal esporádico (panel izquierdo) y análisis de densitometría de la señal de transferencia de Western de SMAD7 (panel derecho); la figura 1 (C) es una transferencia de Western que muestra niveles de SMAD7 y β -actina en IEC y células DLD-1 y HCT-116; la figura 1 (D) muestra el análisis FACS del control del isotipo de IgG conjugado con FITC (isotipo) y la señal del anticuerpo SMAD7 en células HHCT-116 (izquierda) y DLD-1 (derecha); y la figura 1 (E) es una transferencia de Western (panel izquierdo) que muestra niveles de expresión de SMAD7 y β -actina en cuatro líneas celulares de cáncer colorrectal (HCT-116, HCT-115, HT-29 y DLD-1) y una línea celular de carcinoma hepatocelular (HepG2) y el análisis de densitometría de señal de transferencia de Western de SMAD7 de la misma transferencia (panel derecho).

La figura 2 (A) es una serie de gráficas de puntos que representan el número total de células y que indican los porcentajes de células HCT-116 positivas para yoduro de propidio (PI) y para fluorescencia (FITC) transfectadas con oligonucleótido en sentido SMAD7 sin marcar o con dosis crecientes del oligonucleótido antisentido SMAD7 conjugado con FITC GED-0301 (GED-0301 conjugado con FITC); la figura 2 (B) es una transferencia de Western que muestra niveles de SMAD7 y β -actina en células HCT-116 después de transfección con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301; la figura 2 (C) representa una gráfica que muestra el porcentaje de células HCT-116 (barras negras) o DLD-1 (barras blancas) proliferativas después de ningún tratamiento (no tratadas) o de transfección con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301 (izquierda) e histogramas que muestran el porcentaje de proliferación de células HCT-116 después de transfección con oligonucleótidos en sentido SMAD7 (arriba) o GED-0301 (abajo); la figura 2 (D) es una gráfica que muestra el porcentaje de células HCT-116 en diferentes fases del ciclo celular después de ningún tratamiento (no tratadas) o de transfección con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301; y la figura 2 (E) muestra el porcentaje de células HCT-116 proliferativas transfectadas con el oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 y sin tratamiento o expuestas a exceso de proteína TGF- β (TGF- β) o anticuerpo TGF- β (anti-TGF- β).

La figura 3 (A) muestra gráficas que representan el porcentaje de muerte celular de HCT-116 a 24 (arriba) o 48 horas (abajo) después de ningún tratamiento (no tratadas) o de transfección con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301 y gráficas de puntos (abajo) que ilustran la tinción de PI y anexina V (AV) después de transfección de oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301; la figura 4 (B) muestra una serie de gráficas de puntos que cuantifican caspasa 3 activa en células HCT-116 en diferentes puntos temporales después de ningún tratamiento (no tratadas) o de transfección de oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301; la figura 4 (C) es una gráfica que muestra el porcentaje de células expuestas a N-(2-quinolil)valil-aspartil-(2,6-difluorofenoxi)metilcetona (Q-VD-OPH) con caspasa 3 activa después de ningún tratamiento o de transfección con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301; la figura 4 (D) es una gráfica que muestra el porcentaje de muerte celular en células expuestas a Q-VD-OPH y, luego, expuestas a ningún tratamiento o a transfección con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301; y la figura 3 (E) es una gráfica que muestra el porcentaje de células proliferativas expuestas a Q-VD-OPH después de ningún tratamiento o de transfección con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301.

La figura 4 (A) muestra una transferencia de Western de extractos de células HCT-116 a partir de células que no se transfectaron (no tratadas) o se transfectaron con el oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 y se sondaron para CDK2 fosforilada (p-CDK2 (Thr-14/Tyr-15)), CDK2, ciclina A y β -actina; la figura 4 (B) muestra una transferencia de Western de extractos de células HCT-116 a partir de células que no se transfectaron (no tratadas) o se transfectaron con el oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 y se sondaron para CDC25A, CDC25B y CDC25C; la figura 4 (C) muestra la cuantificación de la expresión de ARNm de CDC25A en diferentes puntos temporales en células HCT-116 transfectadas con el oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7; la figura 4 (D) muestra una transferencia de Western de extractos celulares a partir de células que se transfectaron con el oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 y se sondaron para CDC25A o β -actina después de la exposición a los inhibidores de proteosoma MG115 y MG132; la figura 4 (E) es una transferencia de Western de extractos celulares a partir de células que se transfectaron con el oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 y se sondaron para Eif2 α fosforilada (p-Eif2 α (Ser 51)), Eif2 α total, CDC25A, ciclina A y β -actina en diferentes puntos temporales; la figura 4 (F) muestra una transferencia de Western de extractos de células HCT-116 sondados para p-Eif2 α (Ser 51), Eif2 α , CDC25A y β -actina después de la exposición a dimetilsulfóxido (DMSO) o salubrinal; la figura 4 (G) muestra transferencias de Western hechas a partir de extractos de células HCT-116 (paneles izquierdos) o células primarias de cáncer colorrectal (paneles derechos) inmunoprecipitadas con anticuerpo SMAD7 y sondadas con proteína fosfatasa 1 (paneles de arriba), Eif2 α (paneles centrales) o anticuerpo SMAD7; y la figura 4 (H) muestra una transferencia de Western de extractos de células HCT-116 a partir de células que se transfectaron con el oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7, sometidas a inmunoprecipitación del anticuerpo PP1 o Eif2 α , y se sondaron con el anticuerpo opuesto.

La figura 5 (A) muestra inmunotinción de SMAD7 en tejido no tumoral o tumoral de un ratón después de tratamiento con azoximetano y dextrano sulfato de sodio (AOM + DSS) y la figura 5 (B) es una gráfica que muestra la expresión relativa del ARNm de SMAD7 en tejido no tumoral y tumoral de ratones después del tratamiento con AOM + DSS.

La figura 6 (A) muestra la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y la inmunotinción con antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) de explantes de tejido de cáncer colorrectal transfectados con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301; y la figura 6 (B) muestra inmunotinción de SMAD7, PCNA, ciclina A, p-Eif2 α (Ser 51) y CDC25A de explantes de tejidos de cáncer colorrectal humano transfectados con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301.

La figura 7 (A) muestra la distribución de la señal de FITC en xenoinjertos derivados de HCT-116 expuestos a una única inyección de PBS (CTR) o GED-0301 conjugado con FITC después de la inyección en ratones Rag1^{-/-} colonizados con HCT-116; la figura 7 (B) es una transferencia de Western que muestra la expresión de SMAD7 y β -actina en extractos de proteínas de xenoinjertos derivados de HCT-116 expuestos a oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301; la figura 7 (C) es una gráfica que cuantifica el volumen tumoral de xenoinjertos

derivados de ratones tratados con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301 (izquierda) y una fotografía representativa de xenoinjertos del mismo experimento; y la figura 7 (D) muestra inmunotinción de SMAD7, PCNA y ciclina A de xenoinjertos tratados con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301.

5 La figura 8 (A) muestra imágenes endoscópicas (paneles izquierdos) de ratones Apc (Min/+) expuestos a AOM y tratados, posteriormente, con el oligonucleótido en sentido SMAD7 o antisentido, así como análisis endoscópico del número de tumores y puntuación tumoral (gráficas, derecha) y tinción con H&E de secciones de colon de ratones Apc (Min/+) (paneles centrales); la figura 8 (B)-(F) muestran secciones de tejido tumoral (T) y no tumoral (NT) de ratones tratados con el oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 inmunotintados para, respectivamente, SMAD7, PCNA, ciclina A, CDC25A y p-EiF2 α (Ser 51); y la figura 8 (G) muestra la localización del oligonucleótido antisentido conjugado con FITC en tejido intestinal en un ratón Apc (Min/+).

Descripción detallada

Cáncer colorrectal

15 La presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso en procedimientos para el tratamiento del cáncer colorrectal como se expone en las reivindicaciones. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en procedimientos para el tratamiento del cáncer colorrectal que comprende un oligonucleótido antisentido SMAD7 como se expone en las reivindicaciones. "Cáncer colorrectal", como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad caracterizada por la proliferación incontrolada de células del intestino grueso, incluyendo células del colon o del recto. El cáncer colorrectal, generalmente, se origina en células epiteliales del intestino grueso siendo las células madre de la cripta intestinal una posible célula de origen. Las mutaciones genéticas que dan como resultado carcinogénesis incluyen mutaciones en miembros de la ruta de señalización Wnt tales como β -catenina, APC, AXIN1, AXIN2, TCF7L2 y NKD1, miembros de la ruta de señalización de células TGF- β tales como miembros de la familia SMAD y TGF- β 1, proteínas que regulan el equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular tales como TP53 y otras proteínas tales como DCC. La proliferación de las células epiteliales que llevan la mutación o mutaciones causativas puede dar como resultado crecimiento invasivo en las capas musculares y a través de la pared intestinal. Los síntomas del cáncer colorrectal generalmente incluyen hemorragia rectal, anemia, estreñimiento, sangre en el excremento, pérdida de peso, fiebre, pérdida de apetito y náuseas o vómitos. La gran mayoría de tumores de cáncer colorrectal se pueden clasificar como adenocarcinomas mientras que se observan linfomas y carcinomas de células escamosas en un subconjunto más pequeño de casos. Por consiguiente, la expresión "tumor colorrectal", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier crecimiento maligno anormal de tejido asociado con células que se originan en el intestino grueso o patologías de cáncer colorrectal.

35 La expresión "células de cáncer colorrectal", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula de origen que da lugar a cáncer colorrectal o a un tumor colorrectal, una célula asociada con la tumorigénesis, crecimiento, evolución, mantenimiento o soporte de un tumor colorrectal o cualquier otra célula asociada con la manifestación patológica del cáncer colorrectal. "Crecimiento de células de cáncer colorrectal", como se usa en el presente documento, se refiere a la proliferación descontrolada o anormal de células asociadas con una célula de origen del cáncer colorrectal, una célula de tumor colorrectal o cualquier célula asociada con la manifestación de la patología del cáncer colorrectal. El crecimiento de células del cáncer colorrectal puede ser el resultado de una actividad del ciclo celular anormal, fallo para inducir puntos de control del ciclo celular, fallo para inducir apoptosis o pérdida de otras actividades supresoras de tumores.

Tratamiento y evaluación

45 Los términos "tratar", "tratamiento", "tratado" y similares como se usan en el presente documento significan, normalmente, obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de evitar completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) evitar la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar regresión de la enfermedad.

50 La eficacia del tratamiento puede evaluarse mediante medidas de evaluación de síntomas macroscópicos asociados con el cáncer colorrectal, análisis de histología del tejido, ensayo bioquímico, procedimientos de obtención de imágenes tales como, por ejemplo, imágenes de resonancia magnética u otros procedimientos conocidos. Por ejemplo, la eficacia del tratamiento puede evaluarse mediante el análisis del estado anémico, hemorragia rectal, tamaño del tumor u otros aspectos de la patología macroscópica asociados con el cáncer colorrectal después de la administración de un inhibidor de SMAD7 a un paciente con cáncer colorrectal. La eficacia del tratamiento puede también evaluarse a nivel de tejido o celular, por ejemplo, mediante la obtención de una biopsia de tejido o tumor y la evaluación de la morfología o propiedades de tinción de células o tejidos macroscópicos. También se pueden utilizar para evaluar la eficacia del tratamiento ensayos bioquímicos que examinan la expresión de proteínas o ARN. Por ejemplo, se pueden evaluar PCNA, p-CDK2 (Thr-14/Tyr-15) o niveles de otra proteína indicativa de proliferación

celular o actividad de muerte celular en células disociadas o tejido no disociado a través de procedimientos de inmunocitoquímica, inmunohistoquímica o transferencia de Western. También se puede evaluar la presencia o nivel de expresión de biomarcadores útiles encontrados en plasma o tejido tumoral o no tumoral para evaluar la progresión del cáncer y la eficacia del tratamiento.

- 5 Al evaluar la eficacia del tratamiento, se pueden elegir controles adecuados para garantizar una evaluación válida. Por ejemplo, se puede comparar síntomas evaluados en un paciente con cáncer colorrectal después de la administración de un inhibidor de SMAD7 para esos síntomas en el mismo paciente antes de tratar o en otro paciente no diagnosticado con cáncer colorrectal. Alternativamente, se pueden comparar los resultados de análisis bioquímicos o histológicos de tejido tumoral después de la administración de un inhibidor de SMAD7 con los del
10 tejido no tumoral del mismo paciente o de un individuo no diagnosticado con cáncer colorrectal o del mismo paciente antes de la administración del inhibidor de SMAD7.

La validación de la inhibición de SMAD7 puede determinarse mediante evaluación directa o indirecta de niveles o actividad de expresión de SMAD7. Por ejemplo, se pueden utilizar ensayos bioquímicos que miden la expresión de ARN o proteína SMAD7 para evaluar la inhibición global de SMAD7. Por ejemplo, se pueden medir niveles de
15 proteína SMAD7 en tejido tumoral mediante transferencia de Western para evaluar niveles globales de SMAD7. También se pueden medir niveles de ARNm de SMAD7 mediante transferencia de Northern o reacción en cadena de polimerasa cuantitativa para determinar la inhibición global de SMAD7. También se pueden evaluar niveles de proteína SMAD7 o niveles de otra proteína indicativa de actividad de SMAD7 en células disociadas o tejido no disociado mediante procedimientos inmunocitoquímicos o inmunohistoquímicos. También puede evaluarse la
20 inhibición de SMAD7 indirectamente mediante la medición de parámetros tales como la distribución de fase del ciclo celular, tinción con marcadores de muerte celular tales como anexina V o caspasa III o la medición de la alteración en otros parámetros correlacionados con cambios en la actividad de SMAD7. Por ejemplo, pueden medirse niveles de caspasa 3 activa en células de un tumor tratado con un inhibidor de SMAD7 como una indicación de actividad de SMAD7 en dichas células. También puede evaluarse la presencia o nivel de expresión de biomarcadores útiles encontrados en plasma o tejido tumoral o no tumoral para evaluar la eficacia de la inhibición de SMAD7.
25

Al evaluar la eficacia de la atenuación de SMAD7, se pueden elegir controles adecuados para garantizar una evaluación válida. Por ejemplo, se pueden comparar los resultados de análisis bioquímicos o histológicos de tejido tumoral después de la administración de un inhibidor de SMAD7 con los del tejido no tumoral del mismo paciente o de un individuo no diagnosticado con cáncer colorrectal o del mismo paciente antes de la administración del inhibidor de SMAD7.
30

Un "paciente", como se describe en el presente documento, se refiere a cualquier animal en riesgo de o que padece cáncer colorrectal, incluyendo, pero sin limitación, mamíferos, primates y seres humanos. Por ejemplo, un paciente puede ser un individuo diagnosticado con un alto riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal o alguien que ha sido diagnosticado con cáncer colorrectal. En determinadas realizaciones, el paciente puede ser un mamífero no humano tal como, por ejemplo, un gato, un perro o un caballo.
35

Inhibidores de SMAD7

En ciertos ejemplos, un oligonucleótido antisentido antiSMAD7 puede dirigirse al sitio 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299 y/o 533 (es decir, nucleótidos 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299 y 533, respectivamente) del ARNm de SMAD7 humana. En una realización ejemplar, el oligonucleótido antisentido antiSMAD7 se dirige a los ácidos nucleicos 403-423 del ARNm de SMAD7 humana.
40

Un oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento tiene el siguiente oligonucleótido antisentido antiSMAD7 5'-GTCGCCCTTCTCCCCGCAGC-3' (SEQ ID NO: 3).

Se contempla en el presente documento que un oligonucleótido antisentido que se dirige a SMAD7 puede comprender una cadena principal mixta en la que los restos de citosina en un par CpG se reemplazan por 5'-metilcitosina (abreviada como MeC). Los enlaces metilfosfonato también se pueden colocar en los extremos 5' y/o 3' de un oligonucleótido antisentido (abreviados como MeP). La cadena principal de fosfato de un oligonucleótido antisentido antiSMAD7 contemplado puede incluir, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o más enlaces fosforotioato (por ejemplo, enlaces fosforotioato reemplazarían enlaces fosfodiéster). En una realización, todos los enlaces fosfato pueden ser enlaces fosforotioato.
45

50 Las terapias con oligonucleótidos antisentido que se dirigen a SMAD7 incluyen:

5'-GTXYCCCTTCTCCXCYCAG-3' (SEQ ID NO: 4), en la que X es un nucleótido que comprende una base nitrogenada seleccionada del grupo que consiste en citosina y 5-metilcitosina o un nucleósido 2'-O-metilcitosina y en la que Y es un nucleótido que comprende una base nitrogenada seleccionada del grupo que consiste en guanina y 5-metilguanina o un nucleósido 2'-O-metilguanina, siempre que al menos uno de los nucleótidos X o Y comprenda una base nitrogenada metilada;
55

5'-GTXGCCCTTCTCCXGCAG-3' (SEQ ID NO: 5), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosfato;

5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3' (SEQ ID NO: 6), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosfato;

5'-ZTXGCCCTTCTCCCXGCAZ-3' (SEQ ID NO: 7), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosfato y Z es 2'-desoxiguanosina metilfosfonato;

5'-ZTXGCCCTTCTCCCXGCAZC-3' (SEQ ID NO: 8), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosfato y Z es 2'-desoxiguanosina metilfosfonato.

Un oligonucleótido antisentido SMAD7 desvelado en el presente documento incluye:

5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAG-3' (SEQ ID NO: 9), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosforotioato;

5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3' (SEQ ID NO: 10), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosforotioato;

5'-ZTXGCCCTTCTCCCXGCAZ-3' (SEQ ID NO: 11), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosfato y Z es 2'-desoxiguanosina metilfosfonato;

5'-ZTXGCCCTTCTCCCXGCAZC-3' (SEQ ID NO: 12), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosfato y Z es 2'-desoxiguanosina metilfosfonato.

Por ejemplo, las SEQ ID NO. 9-12 incluyen 1, 2, 3, 4 o más enlaces fosforotioato. Todos los enlaces fosfonato O,O de SEQ ID NO. 9-12 pueden ser enlaces fosforotioato.

La presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer colorrectal en un paciente, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10, como se expone en las reivindicaciones. Se describen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

Composiciones farmacéuticas y rutas de administración

Las composiciones farmacéuticas que contienen un oligonucleótido antisentido contra SMAD7, tales como las desveladas en el presente documento, se pueden presentar en una forma de unidad de dosificación y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado. Una composición farmacéutica debe formularse para ser compatible con sus rutas de administración previstas. Se pueden preparar formulaciones útiles mediante procedimientos bien conocidos en la materia farmacéutica. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (Mack Publishing Company, 1990).

Las formulaciones farmacéuticas son, preferentemente, estériles. La esterilización se puede lograr, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización por filtración se puede realizar antes o después de la liofilización y reconstrucción.

Administración parenteral

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para administración parenteral, por ejemplo, formuladas para inyección a través de las rutas intravenosa, intramuscular, subcutánea, intralesional o intraperitoneal. La preparación de una composición acuosa, tal como una composición farmacéutica acuosa que contiene un inhibidor de SMAD7, será conocida por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Normalmente, dichas composiciones se pueden preparar como inyectables, como suspensiones o soluciones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para utilizar para preparar soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y también se pueden emulsionar las preparaciones.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos la forma de ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenaje y debe estar preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Se pueden preparar soluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se puede preparar dispersión en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Además, pueden emplearse aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un disolvente o diluyente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los disolventes o vehículos aceptables que pueden ser empleados están el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. En una realización, se puede suspender el

inhibidor de SMAD7 en un fluido vehículo que comprende carboximetilcelulosa sódica al 1 % (p/v) y TWEEN™ 80 al 0,1 % (v/v). En condiciones normales de almacenamiento y utilización, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

- 5 Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones oleaginosas o acuosas inyectables estériles, de acuerdo con la materia conocida utilizando agentes humectantes o dispersantes adecuados y agentes de suspensión. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de un inhibidor de SMAD7 en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes
- 10 enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y secado por congelación que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente de forma estéril del mismo. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias.
- 15 También se contempla la preparación de soluciones más o altamente concentradas para inyección intramuscular. En este aspecto, se prefiere la utilización de DMSO como disolvente ya que esto dará como resultado una penetración extremadamente rápida, que libera altas concentraciones del inhibidor de SMAD7 a un área pequeña.

Los conservante adecuados para su uso en dicha solución incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato sódico y potásico, boratos sódicos y potásicos, 10 carbonato sódico y potásico, acetato sódico, bifosfato sódico y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH entre aproximadamente pH 6 y pH 8 y, preferentemente, entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5. Los agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro potásico, propilenglicol, cloruro sódico y similares, de modo que el equivalente de cloruro sódico de la solución oftálmica está en el intervalo de 0,9 más o menos al 0,2 %. Los antioxidantes y estabilizantes adecuados

25 incluyen bisulfito sódico, metabisulfito sódico, tiosulfito sódico, tiourea y similares. Los agentes clarificantes y humectantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Los agentes aumentadores de viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares.

- 30 En una realización ejemplar, una composición farmacéutica para administración subcutánea de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 comprende un oligonucleótido antisentido tal como el representado por la SEQ ID NO: 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (tal como sal de sodio) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Administración oral

- 35 En algunas realizaciones, son composiciones adecuadas contempladas en el presente documento para liberación oral de un oligonucleótido antisentido, por ejemplo, comprimidos, que incluyen un recubrimiento entérico, por ejemplo, un recubrimiento gastrorresistente, tal que las composiciones puedan liberar el compuesto antisentido a, por ejemplo, el colon de un paciente. Por ejemplo, dicha administración puede dar como resultado un efecto tópico, aplicando de forma sustancialmente tópica el compuesto antisentido directamente a una porción afectada del colon de un paciente. Dicha administración, puede, en algunas realizaciones, evitar sustancialmente la absorción sistémica
- 40 no deseada del compuesto antisentido.

Por ejemplo, se proporciona un comprimido para administración oral que comprende gránulos (por ejemplo, está al menos parcialmente formado de gránulos) que incluye un compuesto antisentido desvelado, por ejemplo, GED-0301 y excipientes farmacéuticamente aceptables. Dicho comprimido puede recubrirse con un recubrimiento entérico. Los comprimidos contemplados pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables tales como materiales de

45 relleno, aglutinantes, desintegrantes y/o lubricantes, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes como gaulteria, naranja, xilitol, sorbitol, fructosa y maltodextrina y agentes perfumantes, conservantes y/o antioxidantes.

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas contempladas incluyen una fase intragranular que incluye un compuesto antisentido contemplado, por ejemplo, GED-0301 o una sal farmacéuticamente aceptable, por

50 ejemplo, GED-0301 y un material de relleno farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se pueden mezclar juntos GED-0301 y un material de relleno, opcionalmente, con otros excipientes y formarse en gránulos. En algunas realizaciones, la fase intragranular puede formarse utilizando granulación húmeda, por ejemplo, se añade un líquido (por ejemplo, agua) al compuesto antisentido y el material de relleno mezclados y, luego, la combinación se seca, se muele y/o se tamiza para producir gránulos. Un experto en la materia entendería que otros procedimientos pueden

55 utilizarse para lograr una fase intragranular.

En algunas realizaciones, las formulaciones contempladas incluyen una fase extragranular, que puede incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y que pueden mezclarse con la fase intragranular para formar una formulación desvelada.

Una formulación desvelada puede incluir una fase intragranular que incluye un material de relleno. Los materiales de relleno ejemplares incluyen, aunque sin limitación, celulosa, gelatina, fosfato cálcico, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina, pectina, poliacrilato, dextrosa, acetato de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, almidón parcialmente pregelatinizado, carbonato cálcico y otros que incluyen combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, una formulación desvelada puede incluir una fase intragranular y/o una fase extragranular que incluye un aglutinante, que puede, generalmente, funcionar para mantener los ingredientes de la formulación farmacéutica juntos. Los aglutinantes ejemplares pueden incluir, aunque sin limitación, los siguientes: almidones, azúcares, celulosa o celulosa modificada tal como hidroxipropilcelulosa, lactosa, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, etilcelulosa, alcoholes de azúcar u otros que incluyen combinaciones de los mismos.

Las formulaciones contempladas, por ejemplo, que incluyen una fase intragranular y/o una fase extragranular, pueden incluir un disgregante tal como, pero no se limita a, almidón, celulosa, polivinilpirrolidona reticulada, glicolato de almidón de sodio, carboximetilcelulosa sódica, alginatos, almidón de maíz, crosmellosa sódica, carboximetilcelulosa reticulada, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, acacia y otros que incluyen combinaciones de los mismos. Por ejemplo, una fase intragranular y/o una fase extragranular puede incluir un disgregante.

En algunas realizaciones, una formulación contemplada incluye una fase intragranular que comprende un compuesto antisentido desvelado y excipientes elegidos entre: manitol, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa y glicolato de almidón de sodio o combinaciones de los mismos y una fase extragranular que comprende uno o más de: celulosa microcristalina, glicolato de almidón de sodio y estearato de magnesio o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, una formulación contemplada puede incluir un lubricante, por ejemplo, una fase extragranular puede contener un lubricante. Los lubricantes incluyen pero no se limitan a talco, sílice, grasas, estearina, estearato de magnesio, fosfato cálcico, dióxido de silicio, silicato cálcico, fosfato cálcico, dióxido de silicio coloidal, estearatos metálicos, aceite vegetal hidrogenado, almidón de maíz, benzoato sódico, polietilenglicoles, acetato sódico, estearato cálcico, laurilsulfato de sodio, cloruro sódico, laurilsulfato de magnesio, talco y ácido esteárico.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un recubrimiento entérico. Generalmente, los recubrimientos entéricos crean una barrera para la medicación oral que controla la localización en la que se absorbe el fármaco a lo largo del tracto digestivo. Los recubrimientos entéricos pueden incluir un polímero que se desintegra a diferentes velocidades de acuerdo con el pH. Los recubrimientos entéricos pueden incluir por ejemplo, ftalato acetato de celulosa, copolímeros de acrilato de metilo y ácido metacrílico, succinato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímero de metacrilato de metilo y ácido metacrílico, copolímeros de etilacrilato y ácido metacrílico, copolímero de ácido metacrílico tipo C, polivinilacetatoftalato y ftalato acetato de celulosa.

Los recubrimientos entéricos ejemplares incluyen los grados Opadry® AMB, Acryl-EZE®, Eudragit®. En algunas realizaciones, un recubrimiento entérico puede comprender aproximadamente del 5 % al, aproximadamente, 10 %, aproximadamente del 5% al, aproximadamente, 20 %, del 8 al, aproximadamente, 15 %, aproximadamente del 8% al, aproximadamente, 18%, aproximadamente 10 % al, aproximadamente, 12 % o aproximadamente 12 al, aproximadamente, 16%, de un comprimido contemplado en peso. Por ejemplo, los recubrimientos entéricos pueden incluir un copolímero de etilacrilato y ácido metacrílico.

Por ejemplo, un comprimido se desvela que comprende o consiste, esencialmente, en aproximadamente del 0,5 % al, aproximadamente, 70 %, por ejemplo, aproximadamente del 0,5 % al, aproximadamente, 10 % o aproximadamente del 1 % al, aproximadamente 20 %, en peso de un oligonucleótido antisentido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, GED-0301). Dicho comprimido puede incluir, por ejemplo, aproximadamente del 0,5 % al aproximadamente 60 % en peso de manitol, por ejemplo, aproximadamente del 30 % al aproximadamente 50 % en peso de manitol, por ejemplo, aproximadamente 40 % en peso de manitol; y/o aproximadamente del 20 % al aproximadamente 40 % en peso de celulosa microcristalina o aproximadamente del 10 % al aproximadamente 30 % en peso de celulosa microcristalina. Por ejemplo, un comprimido desvelado puede comprender una fase intragranular que incluye aproximadamente del 30 % al aproximadamente 60 %, por ejemplo, aproximadamente del 45 % al aproximadamente 65 % en peso o, alternativamente, aproximadamente del 5 al aproximadamente 10 % en peso de GED-0301, aproximadamente del 30 % al aproximadamente 50 % o, alternativamente, aproximadamente del 5 % al aproximadamente 15 % en peso de manitol, aproximadamente del 5 % al aproximadamente 15 % de celulosa microcristalina, aproximadamente del 0 % al aproximadamente 4 % o aproximadamente del 1 % al aproximadamente 7 % de hidroxipropilmetilcelulosa y aproximadamente del 0 % al aproximadamente 4 %, por ejemplo, aproximadamente del 2 % al aproximadamente 4 % de glicolato de almidón de sodio en peso.

En otra realización, una formulación de comprimido farmacéutico para administración oral de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 comprende una fase intragranular, en la que la fase intragranular incluye un

oligonucleótido antisentido tal como GED-0301 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (tal como sal de sodio) y un material de relleno farmacéuticamente aceptable y que puede incluir también una fase extragranular, que puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un disgregante. La fase extragranular puede incluir componentes elegidos entre celulosa microcristalina, estearato de magnesio y mezclas de los mismos. La composición farmacéutica puede también incluir un recubrimiento entérico de aproximadamente del 12 % al 16 % en peso del comprimido. Por ejemplo, un comprimido farmacéuticamente aceptable para utilización oral puede comprender aproximadamente del 0,5 % al 10 % en peso de un oligonucleótido antisentido, por ejemplo, GED-0301, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, aproximadamente del 30 % al 50 % en peso de manitol, aproximadamente del 10 % al 30 % en peso de celulosa microcristalina y un recubrimiento entérico que comprende un copolímero de etilacrilato y ácido metacrílico.

En otro ejemplo, un comprimido farmacéuticamente aceptable para utilización oral puede comprender una fase intragranular, que comprende aproximadamente del 5 al aproximadamente 10 % en peso de un oligonucleótido antisentido como se expone en las reivindicaciones, por ejemplo, GED-0301, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, aproximadamente 40 % en peso de manitol, aproximadamente 8 % en peso de celulosa microcristalina, aproximadamente 5 % en peso de hidropropilmetilcelulosa y aproximadamente 2 % en peso de glicolato de almidón de sodio; una fase extragranular que comprende aproximadamente 17 % en peso de celulosa microcristalina, aproximadamente 2 % en peso de glicolato de almidón de sodio, aproximadamente 0,4 % en peso de estearato de magnesio; y un recubrimiento entérico sobre el comprimido que comprende un copolímero de etilacrilato y ácido metacrílico.

En algunas realizaciones la composición farmacéutica puede contener un recubrimiento entérico que comprende aproximadamente 13 % o aproximadamente 15 %, 16 %, 17 % o 18 % en peso, por ejemplo, AcrylEZE® (véase, por ejemplo, la publicación PTC n.º WO2010/054826, que aquí es incorporado por referencia en su totalidad).

La velocidad a la que se disuelve el recubrimiento y se libera el principio activo es su velocidad de disolución. En una realización, un comprimido contemplado puede tener un perfil de disolución, por ejemplo, cuando se prueba en un aparato USP/EP tipo 2 (paleta) a 100 rpm y 37 °C en un tampón fosfato con un pH de 7,2, de aproximadamente del 50 % al aproximadamente 100 % del oligonucleótido que se libera después de aproximadamente 120 minutos a aproximadamente 240 minutos, por ejemplo, después de 180 minutos. En otra realización, un comprimido contemplado puede tener un perfil de disolución, por ejemplo cuando se prueba en un aparato USP/EP tipo 2 (paleta) a 100 rpm y 37 °C en HCl diluido con un pH de 1,0, cuando, sustancialmente, ningún oligonucleótido se libera después de 120 minutos. Un comprimido contemplado, en otra realización, puede tener un perfil de disociación, por ejemplo, cuando se prueba en un aparato USP/EP tipo 2 (paleta) a 100 rpm y 37 °C en un tampón fosfato con un pH de 6,6, de aproximadamente del 10 % al aproximadamente 30 % o no más del aproximadamente 50 %, del oligonucleótido que se libera después de 30 minutos.

Las formulaciones divulgadas, por ejemplo, comprimidos, en algunas realizaciones, cuando se administran oralmente al paciente pueden dar como resultado concentración mínima de plasma del oligonucleótido en el paciente. En otra realización, las formulaciones desveladas, cuando se administran oralmente a un paciente, liberan tópicamente al colon o recto de un paciente, por ejemplo, a un sitio afectado o enfermo de un paciente.

Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden incluir además la administración de al menos otro agente que se dirige al tratamiento de enfermedades o trastornos desvelados en el presente documento. Otros agentes contemplados pueden coadministrarse (por ejemplo, secuencialmente o simultáneamente).

Los agentes contemplados incluyen agentes inmunosupresivos que incluyen glucocorticoides, citostáticos, anticuerpos, agentes que se actúan sobre inmunofilinas, interferones, opioides, proteínas de unión a TNF, micofenolatos y agentes biológicos pequeños. Por ejemplo, los agentes inmunosupresivos contemplados incluyen, pero sin limitación: tacrolimus, ciclosporina, pimecrolimus, sirolimus, everolimus, ácido micofenólico, fingolimod, dexametasona, fludarabina, ciclofosfamida, metotrexato, azatioprina, leflunomida, teriflunomida, anakinra, globulina antitimocítica, globulina antilinfocítica, muromonab-CD3, afutuzumab, rituximab, teplizumab, efalizumab, daclizumab, basiliximab, adalimumab, infliximab y etanercept.

Dosificación y frecuencia de administración

Las formulaciones ejemplares incluyen formas de dosificación que incluyen o consisten, esencialmente, en aproximadamente 35 mg a aproximadamente 500 mg de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 como se expone en las reivindicaciones. Por ejemplo, en el presente documento se contemplan formulaciones que incluyen aproximadamente 35 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg o 250 mg de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 como se expone en las reivindicaciones. En una realización, una formulación puede incluir aproximadamente 40 mg, 80 mg o 160 mg de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 como se expone en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, una formulación puede incluir al menos 100 µg de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 como se expone en las reivindicaciones. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg o 25 mg de un oligonucleótido antisentido contra SMAD7 como se expone en las reivindicaciones. La cantidad a administrarse dependerá de variables tales como el tipo o el

alcanze de la enfermedad o indicación a tratar, la salud general y tamaño del paciente, la potencia *in vivo* del oligonucleótido antisentido, la formulación farmacéutica y la ruta de administración. La dosificación inicial se puede aumentar más allá del nivel superior con el fin de lograr rápidamente el nivel en sangre o nivel en tejido deseado. Alternativamente, la dosificación inicial puede ser más pequeña que la óptima y la dosificación puede aumentarse progresivamente durante el curso del tratamiento. Se puede optimizar la dosificación humana, por ejemplo, en un estudio convencional de intensificación de dosis de fase I diseñado para pasar de 40 mg a 160 mg. La frecuencia de dosificación puede variar, dependiendo de factores tales como la ruta de administración, cantidad de dosificación y la enfermedad que se está tratando. Las frecuencias de dosificación ejemplares son una vez al día, una vez por semana y una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la dosificación es una vez al día durante 7 días.

10 **Ejemplos**

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos. Se proporcionan los ejemplos solo para fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitativos del ámbito o contenido de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Niveles de expresión de proteína SMAD7 en células de cáncer colorrectal

Se evaluaron niveles de expresión de proteína SMAD7 en muestras pareadas de mucosa del colon tumoral y no tumoral de cáncer colorrectal tomadas de 6 pacientes sometidos a resección del colon por cáncer colorrectal. La inmunotinción de SMAD7 de tejido tumoral (T) y no tumoral (NT) reveló una acumulación marcada de proteína SMAD7 en tejido tumoral en comparación con el no tumoral, mientras que no se observó tinción cuando se incubaron secciones de cáncer colorrectal con control de isotipo IgG (Isotipo; figura 1A, representativa de tres experimentos separados en los que se analizaron secciones de seis pacientes con cáncer colorrectal). Además, se evaluaron niveles de proteína SMAD7 en 14 pares alineados de tejido tumoral (T) y no tumoral (NY) adyacente de pacientes con cáncer colorrectal mediante transferencia de Western. La transferencia de Western de extracto celular demostró niveles observablemente más altos de SMAD7 en tejido tumoral en comparación con tejido no tumoral (figura 1B, se muestra transferencia de Western de extracto de dos muestras representativas de pacientes). Se utilizó β -actina como un control de carga. La cuantificación de los niveles de expresión de SMAD7 en las mismas transferencias mediante análisis de densitometría confirmó que aumentaron significativamente los niveles de SMAD7 en muestras de cáncer colorrectal en comparación con mucosa no tumoral de los mismos pacientes (figura 1B).

También se investigó la expresión de proteína SMAD7 en líneas celulares de cáncer colorrectal. Se recogieron extractos de proteína total de células de las líneas celulares de cáncer colorrectal DLD-1 y HCT-116 así como de células epiteliales de colon normales (IEC) y se evaluaron para expresión de SMAD7 mediante transferencia de Western (figura 1C). Se aislaron IEC de la mucosa macroscópicamente y microscópicamente no afectada de pacientes sometidos a colectomía por cáncer colorrectal esporádico. La transferencia de Western reveló expresión marcadamente más alta de proteína SMAD7 en células DLD-1 y HCT-116 comparada con IEC. Se confirmó la especificidad de la señal de anticuerpo de SMAD7 mediante análisis FACS de células HCT-116 y DLD-1 marcadas con anticuerpo SMAD7 conjugado con FITC (SMAD7) o control de isotipo IgG (isotipo; figura 1D). Además, el análisis de densitometría y detección por transferencia de Western de los niveles de proteína SMAD7 en extractos recogidos de una serie de líneas celulares de cáncer colorrectal, incluyendo HCT-116, HT-115, HT-29 y DLD-1, revelaron altos niveles de expresión de SMAD7 (figura 1E). En el mismo experimento, se evaluó la expresión de SMAD7 en células HepG2, una línea celular de carcinoma hepatocelular conocido por expresar altos niveles de proteína SMAD7. Se utilizó β -actina como un control de carga en ambos conjuntos de experimentos de transferencia de Western y como estándar de normalización para el análisis de densitometría de banda mostrado en la figura 1E.

Ejemplo 2: Atenuación de niveles de proteína SMAD7 de células de cáncer colorrectal mediante oligonucleótido antisentido SMAD7

Se evaluó la transfección de células de cáncer con el oligonucleótido antisentido SMAD7 GED-0301 en células de la línea celular HCT-116. Se transfectaron células HCT-116 con oligonucleótido en sentido sin marcar (en sentido SMAD7) o con dosis crecientes (0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml o 2 μ g/ml) de GED-0301 conjugado con FITC durante seis horas. La figura 2A muestra gráficas de puntos representativas que cuantifican los porcentajes de células HCT-116 transfectadas positivas para PI y positivas para FITC. Se logró alta eficacia de transfección con niveles muy bajos de muerte celular según se evaluó mediante tinción de PI y FITC. Uno de los dos experimentos representativos en los que se obtuvieron resultados similares se muestra en la figura 2A.

También se evaluó la atenuación de niveles de proteína SMAD7 después de la transfección de cantidades variantes de GED-0301 en células HCT-116. Se transfectaron células HCT-116 con oligonucleótido en sentido SMAD7 (a 2 μ g/ml) o GED-0301 (a 0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml o 2 μ g/ml) durante veinte horas. Posteriormente se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se cultivaron con medio nuevo durante seis horas, se lavaron otra vez con PBS y se cultivaron durante 24 horas adicionales. Luego se analizaron niveles de SMAD7 y β -actina mediante transferencia de Western. La figura 2B muestra uno de tres experimentos representativos, que demuestra atenuación observable de niveles de proteína SMAD7 en células transfectadas con cantidades aumentadas de GED-0301 en comparación con células transfectadas con oligonucleótido en sentido SMAD7. Estos resultados demostraron que un oligonucleótido antisentido SMAD7 (GED-0301) podría transfectarse en células de cáncer colorrectal y podría inducir una atenuación robusta de los niveles de proteína SMAD7.

Ejemplo 3: La administración de oligonucleótidos antisentido SMAD7 afecta la dinámica del ciclo celular en células de cáncer colorrectal

Se evaluó la proliferación celular en células HCT-116 y DLD-1 después de la administración de oligonucleótidos en sentido SMAD7 y GED-0301. No se transfectaron células HCT-116 y DLD-1 (No tratadas) o se transfectaron con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301 a 1 µg/ml. Veinte horas después de la transfección, se lavaron las células con PBS, se cultivaron durante seis horas más, se volvieron a lavar con PBS y se marcaron con éster succinimidilo de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) durante 30 minutos. Luego se lavaron las células marcadas con PBS y se volvieron a cultivar en medio nuevo durante 24 horas adicionales. Se evaluó el porcentaje de células proliferativas mediante citometría de flujo. Se observó un aumento significativo en la proliferación celular en células DLD-1 (barras blancas) y HCT-116 (barras negras) transfectadas con GED-0301 en comparación con células transfectadas con oligonucleótido en sentido SMAD7 (figura 2C; HCT-116: células transfectadas en sentido SMAD7 contra células transfectadas con GED-0301, * P<0,001; DLD-1: células transfectadas en sentido SMAD7 contra células transfectadas con GED-0301, † P<0,001). Los datos en el gráfico representan la media ± desviación estándar (DE) de tres experimentos. Los histogramas en la figura 2C representan el porcentaje total de proliferación celular en células HCT-116 transfectadas con oligonucleótidos en sentido SMAD7 (82 %) o GED-0301(47 %) de un experimento único. Por lo tanto, la administración en líneas celulares HCT-116 y DLD-1 de carcinoma colorrectal de un oligonucleótido AS de SMAD7 dio como resultado una disminución significativa en la proliferación celular.

También se analizó la distribución de células en diferentes fases del ciclo celular en células HCT-116 después de la transfección de GED-0301. No se transfectaron células HCT-116 (no tratadas) o se transfectaron con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301. Se transfectaron células HCT-116 con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301 a 1 µg/ml. Veinte horas después de la transfección, se lavaron las células con PBS y se cultivaron en medio nuevo durante 24 horas adicionales. Luego se evaluaron los porcentajes de células en diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de células que residen en la fase S y una disminución concomitante estadísticamente significativa en el porcentaje de células que constituyen la población G0/G1 se observaron en células transfectadas con GED-0301 en comparación con los controles (figura 2D); células transfectadas con GED-0301 contra células transfectadas en sentido SMAD7, para la fase S, ** P=0,001; para la fase G0/G1, * P=0,01). Se muestra uno de tres experimentos representativos en los que se obtuvieron resultados similares. Estos resultados demuestran que la atenuación de la proteína SMAD7 facilitada mediante la administración del oligonucleótido antisentido SMAD7 GED-0301 dio como resultado una distribución alterada de la población de fase del ciclo celular en células de cáncer colorrectal.

Las células de cáncer colorrectal a menudo llevan mutaciones en genes que median la señalización de TGF-β1, haciéndolos insensibles a cambios en la actividad de TGF-β1. Por lo tanto, se investigó la relación entre los efectos observados sobre la proliferación celular inducida mediante cambios en la actividad de SMAD7 y la actividad de señalización de TGF-β1 en líneas celulares humanas HCT-116 y DLD-1 de cáncer colorrectal. Se expusieron células transfectadas con un oligonucleótido en sentido SMAD7 (S) a la proteína TGF-β1 o a un anticuerpo neutralizante de TGF-β1. Ni la exposición al aumento de TGF-β1 ni la inhibición de la actividad de TGF-β1 a través de la exposición del anticuerpo dieron como resultado un cambio observable en la proliferación celular. Además, las células transfectadas con GED-0301 (AS) y expuestas a los mismos tratamientos tampoco mostraron cambios en la proliferación celular con respecto a las células transfectadas con GED-0301 no tratadas (figura 2E, se muestran los datos de HCT-116). Estos resultados demostraron que los efectos promitogénicos de la señalización de SMAD7 observados en células de cáncer colorrectal son independientes de la actividad de TGF-β1.

Ejemplo 4: La administración de oligonucleótidos antisentido SMAD7 causa muerte celular aumentada en células de cáncer colorrectal

Se avaluó la muerte celular en células HCT-116 después de la administración del oligonucleótido antisentido SMAD7 GED-0301 para determinar si los cambios observados en la distribución del ciclo celular se correlacionaban con la activación de programas de muerte celular. Para investigar la muerte celular, se dejaron sin tratar células HCT-116 (no tratadas) o se transfectaron con oligonucleótido en sentido SMAD7 o GED-0301 a 1 µg/ml durante veinte horas. Luego se lavaron las células con PBS, se cultivaron durante seis horas adicionales, se volvieron a lavar con PBS y se cultivaron en medio nuevo durante otras 24 a 48 horas (figura 3A, paneles superior y central, respectivamente). Se evaluó la muerte celular mediante análisis de citometría de flujo de tinción con AV y/o PI. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de muerte celular según se evaluó mediante poblaciones combinadas de AV-/PI+, AV+/PI+ y AV+/PI- a 48 horas para células HCT-116 transfectadas con GED-0301 en comparación con células transfectadas con oligonucleótido en sentido SMAD7 (figura 3A, panel central; en sentido SMAD7 contra GED-0301, P<0,001). Se expresan los resultados como la media ± DE de tres experimentos. Las gráficas de puntos representativas (figura 3A, panel inferior) muestran los porcentajes de AV- y/o PI positivo de células HCT-116 48 horas después de la transfección.

Para evaluar adicionalmente la activación de rutas de muerte celular en células de cáncer colorrectal después de la atenuación de SMAD7, se investigó el porcentaje de células que expresan caspasa 3 activa en células transfectadas con GED-0301. Se dejaron sin tratar células HCT-116 (no tratadas) o se transfectaron con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301 a 1 µg/ml durante veinte horas. Luego se lavaron las células con PBS y se cultivaron durante otras seis horas con medio completo nuevo antes de lavarse con PBS y cultivarse en medio nuevo durante

16, 24 o 36 horas adicionales. Luego se evaluó la activación de caspasa 3 mediante citometría de flujo. Las gráficas de puntos en la figura 3B muestran un aumento notable en caspasa 3 activa en células transfectadas con GED-0301 en comparación con células transfectadas en sentido SMAD7 y no transfectadas. Además, la transfección con GED-0301 dio como resultado porcentajes progresivamente más altos de células con caspasa 3 activa en cada punto temporal. Estos resultados demuestran que en la línea celular HCT-116 de cáncer colorrectal, la administración de GED-0301 dio como resultado un aumento significativo en el porcentaje de células sometidas a muerte celular o que expresan caspasa 3 activa en comparación con los controles.

Para determinar si la muerte celular podría bloquearse en células transfectadas con GED-0301, se cultivaron células en medio normal o en presencia del inhibidor de todas las caspasas Q-VD-OPH o DMSO, durante una hora y, luego, se dejaron sin tratar o de transfectaron con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301 durante 36 horas. Se evaluó el porcentaje de células que expresan caspasa 3 activa mediante citometría de flujo. Si bien no se observó diferencia significativa en ninguno de los grupos no transfectados o transfectados en sentido SMAD7, se observó una disminución significativa en el porcentaje de células que expresan caspasa 3 activa entre células transfectadas con GED-0301 no expuestas a ningún fármaco o expuestas a Q-VD-OPH (figura 3C; sin fármaco contra Q-VD-OPH, $P=0,002$).

Se utilizó el mismo protocolo para evaluar el porcentaje de muerte celular, excepto que las células se evaluaron 48 horas después de la transfección y se evaluó el porcentaje de muerte celular mediante la observación de las poblaciones combinadas de AV- y/o PI positivas dentro de la población celular total. Si bien no se observó diferencia significativa en ninguno de los grupos no transfectados o transfectados en sentido SMAD7, se observó una disminución significativa en el porcentaje de células sometidas a muerte celular entre células transfectadas con GED-0301 no expuestas a ningún fármaco o expuestas a Q-VD-OPH (Figura 3D; Sin fármaco *contra* Q-VD-OPH, $P=0,008$).

Para determinar si la detención del crecimiento celular de HCT-116 inducida con GED-0301 es secundaria a la inducción de muerte celular, se evaluó la proliferación celular en células transfectadas con GED-0301 expuestas a Q-VD-OPH. Se cultivaron las células en medio normal o en presencia o ausencia de Q-VD-OPH o DMSO durante una hora y, luego, se dejaron sin tratar o se transfectaron con oligonucleótido en sentido SMAD7 o GED-0301. Después de 24 horas se evaluó el porcentaje de células proliferativas mediante citometría de flujo. Independientemente de la exposición a Q-VD-OPH, todas las poblaciones celulares transfectadas con GED-0301 mostraron una disminución en el porcentaje de células proliferativas en comparación con los grupos transfectados en sentido SMAD7 y no transfectados, demostrando que la muerte celular es un efecto secundario de la proliferación disminuida en células de cáncer colorrectal sometidas a la atenuación de proteínas SMAD7 (figura 3E). Los resultados mostrados en las figuras 3 C-E son la media \pm DE de tres experimentos.

Ejemplo 5: El oligonucleótido antisentido SMAD7 altera la interacción de los componentes de señalización de TGF β 1 corriente abajo y afecta la expresión y actividad de la proteína reguladora del ciclo celular

La progresión a través del ciclo celular se regula mediante quinasas dependientes de ciclinas (CDK), que se asocian con parejas activadoras, conocidas como ciclinas, para regular la actividad de proteínas que juegan un papel en la progresión del ciclo celular. La actividad de CDK se modula mediante fosforilación activadora e inhibidora. Por ejemplo, se puede inhibir el complejo CDK-ciclina mediante fosforilación de los restos Thr-14 y Tyr-15 dentro del bolsillo de unión a ATP de las CDK. CDK2 juega un papel central en el control de la fase S, uniendo a ciclina E o ciclina A para regular la transición G1/S y la progresión de la fase S, respectivamente.

Para analizar el impacto de la expresión de SMAD7 sobre la actividad CKD2/ciclina en células de cáncer colorrectal, se analizó el estado de fosforilación de CDK2 en células HCT-116 después de la transfección con GED-0301. Se dejaron sin transfectar células HCT-116 (no tratadas) o se transfectaron con oligonucleótido en sentido SMAD7 (S) o antisentido SMAD7 (AS) a 1 μ g/ml. Seis horas después de la transfección, se lavaron las células con PBS y se volvieron a cultivar con medio nuevo durante 16 horas adicionales. Se analizaron los niveles de p-CDK2 (Thr-14/Tyr-15), CDK2, ciclina A y β -actina mediante transferencia de Western de extractos de células. Uno de los tres experimentos representativos en los que se observaron resultados similares se muestra en la figura 4A. La transferencia en la figura 4A demuestra que la transfección de células HCT-116 con GED-0301 dio como resultado un aumento observable en niveles de p-CDK2 (Thr-14/Tyr-15) en comparación con los controles, así como una disminución en los niveles de ciclina A, que proporciona un mecanismo para explicar la acumulación de células en la fase S después de la administración de GED-0301.

La activación de CDK2 es estrictamente dependiente de la actividad de una fosfatasa especializada, CDC25, que desfosforila y activa complejos de CDK/ciclina. Existen tres miembros de la familia de CDC25 humana. CDC25A controla la progresión a través de la fase S, mientras que CDC25B y CDC25C están implicadas en el control de la transición de G2 a mitosis. Se examinaron los niveles de miembros de la familia de CDC25 para determinar si se asociaba la inactivación/fosforilación de CDK2 en células deficientes en SMAD7 con la expresión disminuida de proteínas CDC25. Se dejaron de tratar células HCT-116 (no tratadas) o se transfectaron con oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 a 1 μ g/ml durante 20 horas en medio libre de suero. Luego se lavaron las células con PBS y se cultivaron en medio de suero bovino fetal (FBS) al 10 % durante 24 horas más. Se acompañó la atenuación de SMAD7 mediante una reducción marcada de la expresión de la proteína CDC25A, mientras que los

niveles de CDC25B y CDC25C se mantuvieron sin cambios (figura 4B; los resultados son representativos de tres experimentos). Por lo tanto, La actividad de SMAD7 parece necesaria para la expresión robusta de CDC25A en células cáncer colorrectal.

5 La concentración intracelular de CDC25A se puede regular a múltiples niveles. Para determinar si la regulación negativa de la proteína CDC25A inducida por oligonucleótidos antisentido SMAD7 resultaba de la inhibición de la transcripción de CDC25A, se extrajo el ARN total de células HCT-116 transfectadas con oligonucleótidos en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 y se cultivó durante diferentes periodos de tiempo y se analizó para niveles de ARNm de CDC25A mediante PCR en tiempo real. Se normalizó la señal de PCR en tiempo real de CDC25A a la señal de β -actina. Se transfectaron todas las células con oligonucleótidos a 1 μ g/ml durante 20 horas en medio libre de suero, se lavaron con PBS y se cultivaron con medio que contenía FBS al 10 %. Luego, se volvieron a lavar las células después de 4 horas y se cultivaron en medio libre de suero durante los puntos temporales indicados. Los niveles de transcripción de ARN de CDC25A se incrementaron, en lugar de regulados negativamente, en células tratadas con oligonucleótido antisentido SMAD7 (barras negras) en comparación con las células tratadas con oligonucleótido en sentido SMAD7 (barras blancas; la figura 4C muestra la media \pm error estándar de la media (SEM) de tres experimentos). Este dato demostró una disociación entre la proteína CDC25A y los niveles de ARN en células de cáncer colorrectal deficientes en SMAD7 y sugirió que la regulación de la expresión de proteína CDC25A mediante SMAD7 se produce a través de un mecanismo traduccional o postraduccional (por ejemplo, dependiente de proteosoma).

20 Para determinar si un mecanismo dependiente de proteosoma representaba la disminución de CDC25A observada en células atenuadas SMAD7, se expusieron células transfectadas con oligonucleótidos en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 a los inhibidores de proteosomas MG115 y MG132 durante 24 horas después de la transfección. El tratamiento de células de cáncer colorrectal con estos inhibidores de proteosomas no evitan la inhibición de la expresión de la proteína CDC25A (figura 4D; transferencia representativa de uno de tres experimentos).

25 También se regula la expresión de la proteína CDC25A mediante el factor de iniciación eucariótico 2 alfa (EiF2 α), que es esencial para la atenuación de la traducción de diversas proteínas (Tomko y Lazo, (2008) Cancer Res. 68(18):7457-7465). La actividad de EiF2 α está regulada mediante la fosforilación en Ser 51, que da como resultado el secuestro de EiF2 α (Wek y col., (2006) Biochem. Soc. Trans. 34:7-11). Por lo tanto, la hiperfosforilación de EiF2 α da como resultado una disminución marcada de la expresión de la proteína CDC25A. Por lo tanto, se investigó el estado de fosforilación de EiF2 α en células de cáncer colorrectal tratadas con antisentido SMAD7 para determinar si los cambios en la actividad de EiF2 α podrían explicar los cambios observados en los niveles de CDC25A. Se transfectaron células a 1 μ g/ml durante 20 horas en medio libre de suero, se lavaron con PBS y se cultivaron con medio que contenía FBS al 10 %. Luego, se volvieron a lavar las células después de 4 horas y se cultivaron en medio libre de suero durante los puntos temporales indicados (figura 4E; 12, 18 o 24 horas). El silenciamiento de SMAD7 en células HCT116 y DLD-1 a través de la exposición a oligonucleótido antisentido (AS) SMAD7 aumentó la fosforilación de EiF2 α Ser 51 y precedió la regulación negativa de proteína CDC25A y ciclina A (figura 4E; se muestra una de tres transferencias representativas).

40 Para confirmar la unión entre la actividad EiF2 α y la expresión de CDC25A en células de cáncer colorrectal, se inhibió específicamente la función de EiF2 α en células HCT116 y DLD-1 mediante salubrinal, un compuesto que interfiere con la desfosforilación de EiF2 α Ser51. Se trataron células HCT-116 con DMSO o salubrinal durante 6 a 24 horas y, luego, se sondaron extractos de células mediante transferencia de Western para p-EiF2 α (Ser 51), EiF2 α total, CDC25A o β -actina. El tratamiento de células de cáncer colorrectal con salubrinal dio como resultado un aumento de EiF2 α fosforilada y una disminución concominada de los niveles de proteína CDC25A, respecto a los controles tratados con DMSO (figura 4F; se muestra una de tres transferencias representativas). Estos resultados demostraron que la atenuación de SMAD7 altera la fosforilación de EiF2 α , que a su vez afecta a los niveles de expresión de CDC25A en células de cáncer colorrectal.

50 SMAD7 también interactúa con la detención del crecimiento y la proteína de daño del ADN (GADD34), una subunidad reguladora de la holoenzima de la proteína fosfatasa 1 (PP1), que promueve así la señalización del receptor de TGF β tipo I. También puede interactuar con el complejo GAD334/PP1 y promover la desfosforilación de EiF2 α . Se examinó la asociación entre estos componentes moleculares diferentes en células de cáncer colorrectal mediante la realización de experimentos de inmunoprecipitación y transferencia de Western. Se realizó inmunoprecipitación de extractos celulares enteros de células HCT-116 (panel izquierdo), DLD-1 (no mostradas) y células primarias de cáncer colorrectal (panel derecho) utilizando anticuerpo anti SMAD7 seguido por análisis Western con anticuerpos anti-PP1 (arriba), anto-EiF2 α (central) o anti-SMAD7 (abajo) (figura 4G, se muestra una de tres transferencias representativas para cada experimento; IP = inmunoprecipitación, n.s. = banda inespecífica).

55 También se probaron transferencias con anticuerpos de control específicos de isotipo (carril derecho de cada transferencia; vo-). Este experimento demostró que SMAD7 endógena interactúa con PP1 y EiF2 α en líneas celulares de cáncer colorrectal y células primarias aisladas de tejido tumoral de cáncer colorrectal reciente.

60 Además experimentos de inmunoprecipitación/inmunotransferencia en células HCT-116 transfectadas con oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 mostraron que el silenciamiento de SMAD7 redujo marcadamente la asociación entre PP1 y EiF2 α (figura 4H; se muestra una de tres transferencias representativas para cada experimento; n.s. = señal inespecífica). Se sometieron los extractos de células HCT-116 de células

transfectadas a inmunoprecipitación mediante anticuerpo PP1 y se sondaron mediante transferencia de Western utilizando el anticuerpo Eif2 α (arriba) o viceversa (abajo). También se sondaron transferencias con anticuerpo específico de isotipo (Vo-) como un control. Por lo tanto, SMAD7 juega un papel importante en la mediación de la asociación entre la holoenzima PP1 y Eif2 α , que afecta a la actividad de Eif2 α . Además, la administración de oligonucleótido antisentido SMAD7 dio como resultado una disociación de estos componentes y una disminución resultante en la expresión de ciclina A y CDC25A, que proporciona un mecanismo para explicar la proliferación celular alterada y la progresión del ciclo celular observado en células de cáncer colorrectal tras la exposición al oligonucleótido antisentido SMAD7.

Ejemplo 6: La expresión *in vivo* de ARNm y proteína SMAD7 se incrementa en un modelo de ratón de cáncer colorrectal inducido

Se evaluaron la expresión de ARNm y proteína SMAD7 en áreas tumorales y no tumorales de ratones con cáncer colorrectal asociado a colitis para determinar si la inducción del cáncer colorrectal *in vivo* se asociaba con niveles de SMAD7 aumentados. En el modelo utilizado en el presente documento, se administró AOM a ratones C57BL/6J seguido de ingestión repetida de DSS (AOM+DSS), causando inflamación colónica y desarrollo posterior de múltiples tumores colónicos. Se sacrificaron animales 84 días después del tratamiento con AOM+DSS. Se evaluaron los niveles de proteína SMAD7 mediante inmunotinción de áreas no tumorales y tumorales de tejido recogido de ratones con cáncer colorrectal asociado a colitis. La figura 5A muestra un aumento claro en inmunotinción de SMAD7 en áreas tumorales de ratones tratados con AOM+DSS. La imagen está tomada de uno de los tres experimentos realizados. También aumentó la expresión de ARNm de SMAD7 en áreas tumorales en comparación con áreas no tumorales de ratones tratados con AOM+DSS evaluados mediante PCR en tiempo real (Fig. 5B). Los valores de la figura 5B representan la media \pm SEM y se incluyeron seis ratones en cada grupo. Por lo tanto, se correlacionó la expresión aumentada *in vivo* de ARNm y, en particular, de proteína SMAD7 con la inducción de cáncer colorrectal exclusivamente en tejido tumoral.

Ejemplo 7: La administración de oligonucleótidos antisentido SMAD7 da como resultado proliferación disminuida de células de explantes de tejidos

Para evaluar el efecto de la atenuación facilitada por el oligonucleótido antisentido SMAD7 sobre la proliferación celular en tejido, se realizó tinción H&E o inmunotinción PCNA sobre secciones de explantes de tejido de cáncer colorrectal *ex-vivo*. Se transfectaron los explantes de tejido fresco con oligonucleótidos en sentido SMAD7 o GED-0301 durante 36 horas y luego se tiñeron. La figura 6A representa imágenes de secciones teñidas con H&E y PCNA de explantes obtenidos recientemente. Se observó una disminución clara en tinción H&E e inmunoseñal PCNA en explantes de tejido transfectado con GED-0301 en comparación con explantes transfectados con oligonucleótido en sentido SMAD7, demostrando que GED-0301 reduce eficazmente la proliferación celular en tejido transfectado. Se muestran imágenes de uno de dos experimentos representativos.

De forma similar, se añadió oligonucleótido en sentido (S) o antisentido (AS) SMAD7 a cultivos de órganos de explantes de tejido de cáncer colorrectal humanos y se analizaron proteínas relacionadas con el crecimiento celular y el ciclo celular después de 24 horas. La inmunohistoquímica de secciones seriadas de explantes de tejido de cáncer colorrectal mostró que el oligonucleótido antisentido SMAD7 redujo la fracción de células de cáncer colorrectal que expresan SMAD7, PCNA, ciclina A y CDC25A, y aumentó el porcentaje de células positivas para p-Eif2 α (Ser51) (figura 6B). Las imágenes muestran uno de cinco resultados representativos, mientras que se muestra la tinción de control de isotipo en la columna izquierda.

Ejemplo 8: La administración de oligonucleótidos antisentido SMAD7 reduce *in vivo* el crecimiento tumoral y la proliferación celular de cáncer colorrectal en un modelo de ratón de xenoinjerto

Se utilizó un modelo de xenoinjerto HCT-116 para evaluar el efecto de la administración de GED-0301 tras el desarrollo tumoral de cáncer colorrectal y la proliferación celular de cáncer colorrectal. Con ese fin, se inocularon ratones Rag-1^{-/-} con células HCT-116 (5×10^5 células en 500 μ l de matrigel). Una semana después de la inoculación, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal única de PBS (figura 7A, CTR) o 100 μ g de GED-0301 conjugado con FITC (figura 7A, GED-0301 conjugado con FITC). Se sacrificaron los ratones 24 horas después de la inyección del reactivo, se extirparon los tumores y se evaluó la distribución de GED-0301 conjugado con FITC mediante señal inmunofluorescente. La señal FITC se localizó claramente con señal nuclear de células de xenoinjerto (figura 7A, panel Dapi/FITC).

También se evaluó la señal de proteína SMAD7 en xenoinjertos de animales sometidos a administración de GED-0301. Se inocularon células HCT-116 en ratones Rag-1^{-/-} y se trataron los animales intraperitonealmente con oligonucleótido en sentido SMAD7 o GED-0301. Se administraron ambos oligonucleótidos a 100 μ g/ratón cada día, empezando 7 días después de la inyección de HCT-116. Se sacrificaron los ratones 21 días después de la inoculación de células HCT-116. La transferencia de Western del extracto de proteínas total de tejido de xenoinjerto reveló niveles observablemente disminuidos de señal SMAD7 en muestras de ratones tratados con GED-0301 pero no de ratones tratados con oligonucleótido en sentido SMAD7 (figura 7B). Se utilizó β -actina como control de carga. Por lo tanto, GED-0301 fue capaz de atenuar *in vivo* los niveles de proteína SMAD7 en células de xenoinjerto de cáncer colorrectal.

Se analizaron xenoinjertos recogidos de ratones sometidos al mismo protocolo descrito anteriormente para el volumen de tumores generados en cada grupo. Se observó una disminución significativa en el volumen tumoral en ratones inoculados con HCT-116 tratados con GED-0301 en comparación con ratones tratados con oligonucleótido en sentido SMAD7 (figura 7C). La gráfica de la figura 7C muestra el volumen tumoral medio a 21 días para ratones tratados con oligonucleótido en sentido SMAD7 o GED-0301 (figura 7C, panel izquierdo; en sentido SMAD7 contra GED-0301, $P < 0,001$; media de dos experimentos independientes, ≥ 12 ratones por grupo; las barras indican la media \pm DE). La figura 7C (panel derecho) proporciona una fotografía representativa de xenoinjertos desarrollados en ratones tratados con el sentido SMAD7 (fila superior) y tratados con GED-0301 (fila inferior). Los resultados demuestran claramente que la atenuación con GED-0301 de SMAD7 inhibe el crecimiento de tumores colorrectales en modelos de xenoinjerto.

La inmunotinción para SMAD7, el marcador de proliferación celular PCNA y el compañero de CDK2 ciclina A también se realizaron en secciones de tejido de xenoinjerto recogidas de ratones que se sometieron al mismo protocolo descrito anteriormente. Las imágenes representativas de secciones de xenoinjertos teñidos de SMAD7, PCNA y ciclina A se muestran en la figura 7D. Se muestran imágenes de uno de seis experimentos representativos. La tinción del control de isotipo se muestra en la columna izquierda (isotipo). Se observó una disminución en las tres señales en secciones de tejido tomadas de xenoinjertos desarrollados en ratones tratados con GED-0301 (AS) en comparación con aquellos ratones tratados con el sentido SMAD7 (S), demostrando que la atenuación mediada con oligonucleótidos antisentido SMAD7 de la proteína SMAD7 dio como resultado proliferación celular disminuida en células de cáncer colorrectal *in vivo*.

Ejemplo 9: La administración de oligonucleótidos antisentido SMAD7 inhibe tumorigénesis en un modelo de cáncer colorrectal espontáneo

Se examinó *in vivo* la capacidad del oligonucleótido antisentido SMAD7 para inhibir tumorigénesis intestinal utilizando un modelo de ratón de cáncer colorrectal espontáneo. Específicamente, para estos experimentos se utilizaron ratones con neoplasia intestinal múltiple (Min), que portan una mutación dominante en el gen de la poliposis coli adenomatosa (Apc). Este modelo de ratón se asemeja a la enfermedad humana conocida como poliposis adenomatosa familiar, que también está causada por mutaciones en el gen APC. El tratamiento de ratones Apc (Min/+) con la AOM carcinogénica aumenta la incidencia, el número y el tamaño del tumor, particularmente en el colon. Se trataron ratones intraperitonealmente (i.p) con AOM (10 mg/kg) una vez a la semana durante dos semanas y se controlaron durante la formación de tumores. Una semana después de la última inyección de AOM, los ratones se trataron oralmente con 125 μ g/ratón de oligonucleótido antisentido (AS) o en sentido (S) SMAD7 tres veces a la semana hasta el sacrificio en el día 80. En paralelo, los ratones recibieron dosis orales de oligonucleótido no marcado (CTR) u oligonucleótido antisentido SMAD7 conjugado con FITC (AS conjugado con FITC; 125 μ g/ratón) y se sacrificaron 8 horas más tarde para evaluar la absorción intestinal del oligonucleótido (figura 8G). El análisis de secciones de tejido intestinal reveló la presencia de señal FITC, indicando que el oligonucleótido antisentido localizó el tejido diana.

Una endoscopia en el día 72 mostró que ratones tratados con oligonucleótido en sentido SMAD7 desarrollaron múltiples tumores grandes, mientras que se redujeron el número y el tamaño de tumores en el colon de ratones tratados con oligonucleótidos antisentido SMAD7 (figura 8A, paneles izquierdos). Los análisis endoscópicos del número de tumores y de la puntuación tumoral revelaron una disminución significativa en estos parámetros en ratones tratados con oligonucleótidos antisentido SMAD7 contra ratones tratados con oligonucleótidos en sentido SMAD7 (figura 8A, gráficas; para número de tumoral, S contra AS, $P = 0,004$; para puntuación tumoral, S contra AS, $P = 0,001$; para ambas gráficas, las barras indican la media \pm SEM, 3 experimentos individuales, ≥ 5 ratones por grupo). Estos resultados se confirmaron mediante evaluación directa de tumores en ratones sacrificados el día 80. Específicamente, la tinción H&E de tejido de colon reveló la presencia de crecimientos grandes en ratones tratados con oligonucleótidos en sentido SMAD7 pero no antisentido (figura 8A, paneles centrales).

La inmunohistoquímica de secciones tumorales (T) y no tumorales (NT) mostró que SMAD7 estaba regulada positivamente en las áreas neoplásicas expuestas a oligonucleótidos en sentido SMAD7 (S) e inhibida mediante el tratamiento con oligonucleótidos antisentido (AS, figura 8B). La tinción con PCNA confirmó el efecto antiproliferativo del oligonucleótido antisentido Smad7 (figura 8C). Además, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido redujo los niveles de ciclina A y CDC25A (figura 8D, E) y reguló positivamente los niveles de p-EIF2 α (Ser 51) (figura 8F) en las áreas tumorales. Por lo tanto, GED-0301 inhibió con éxito la formación y crecimiento tumoral *in vivo* en múltiples modelos animales de cáncer colorrectal.

El alcance de la invención está indicado por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por la descripción anterior, y todos los cambios que entran dentro del significado y rango de las reivindicaciones pretenden incluirse en la misma.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOGRA PHARMA LIMITED

<120> PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORRECTAL

<130> PT533PCT

<140>
 <141>

 <150> 61/847.287
 <151> 17/07/2013
 5 <150> 61/790.488
 <151> 15/03/2013

 <160> 12

 <170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1
 10 <400> 1
 000

 <210> 2

 <400> 2
 000
 15 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

 <400> 3
 gtcgcccctt ctccccgcag c 21

 <210> 4
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> Citosina, 5-metilcitosina o un nucleósido 2'-O-metilcitosina
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)l
 <223> Guanina, 5-metilguanina o un nucleósido 2'-O-metilguanina

 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> Citosina, 5-metilcitosina o un nucleósido 2'-O-metilcitosina

 <220>
 45 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> Guanina, 5-metilguanina o un nucleósido 2'-O-metilguanina

 <400> 4
 gtcgcccctt ctccccgcag 20

 <210> 5
 50 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

15 <400> 5
 gtcgcccctt ctccccgcag 20

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

<400> 6
 gtcgcccctt ctccccgcag c 21

35 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-desoxiguanosina metilfosfonato

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20) .. (20)

<223> 2'-desoxiguanosina metilfosfonato

<400> 7
 gtcgcccctt ctccccgcag 20

5 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-desoxiguanosina metilfosfonato

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20) .. (20)
 <223> 2'-desoxiguanosina metilfosfonato

<400> 8
 gtcgcccctt ctccccgcag c 21

35 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosforotioato

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosforotioato

<400> 9
 gtcgcccctt ctccccgcag 20

<210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<220>

<221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosforotioato

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidina 5'-monofosforotioato

<400> 10
 gtcgcccctt ctccccgcag c 21

10

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-desoxiguanosina metiltiofosfonato

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20) .. (20)
 <223> 2'-desoxiguanosina metiltiofosfonato

<400> 11
 gtcgcccctt ctccccgcag 20

35

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-desoxiguanosina metiltiofosfonato

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (16) .. (16)
 <223> 5-metil 2'-desoxicitidine 5'-monofosfato

<220>

<221> base_modificada
<222> (20) .. (20)
<223> 2'-desoxiguanosina metilfosfonato

5 <400> 12
gtcgcccctt ctccccgcag c 21

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer colorrectal en un paciente, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10.
- 5 2. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10.
3. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6.
- 10 4. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 es para administración parenteral.
5. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 es para administración oral.
- 15 6. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho oligonucleótido antisentido SMAD7 está junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una composición farmacéutica.
7. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según la reivindicación 6, en el que la composición farmacéutica comprende un recubrimiento entérico que comprende un copolímero de etilacrilato y ácido metacrílico.
8. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paciente es un ser humano.
- 20 9. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho procedimiento comprende la administración de al menos 100 µg del oligonucleótido antisentido.
10. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según la reivindicación 9, en el que dicho procedimiento comprende la administración de 35 mg a 500 mg del oligonucleótido antisentido.
- 25 11. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal, que comprende un oligonucleótido antisentido SMAD7 que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que el oligonucleótido antisentido SMAD7 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10.
- 30 13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que el oligonucleótido antisentido SMAD7 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6.
14. El oligonucleótido antisentido SMAD7 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 a 10, en el que el oligonucleótido antisentido SMAD7 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y en el que la secuencia de nucleótidos comprende dos o más enlaces fosforotioato.
- 35 15. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el oligonucleótido antisentido SMAD7 comprende dos o más enlaces fosforotioato.

Figura 1

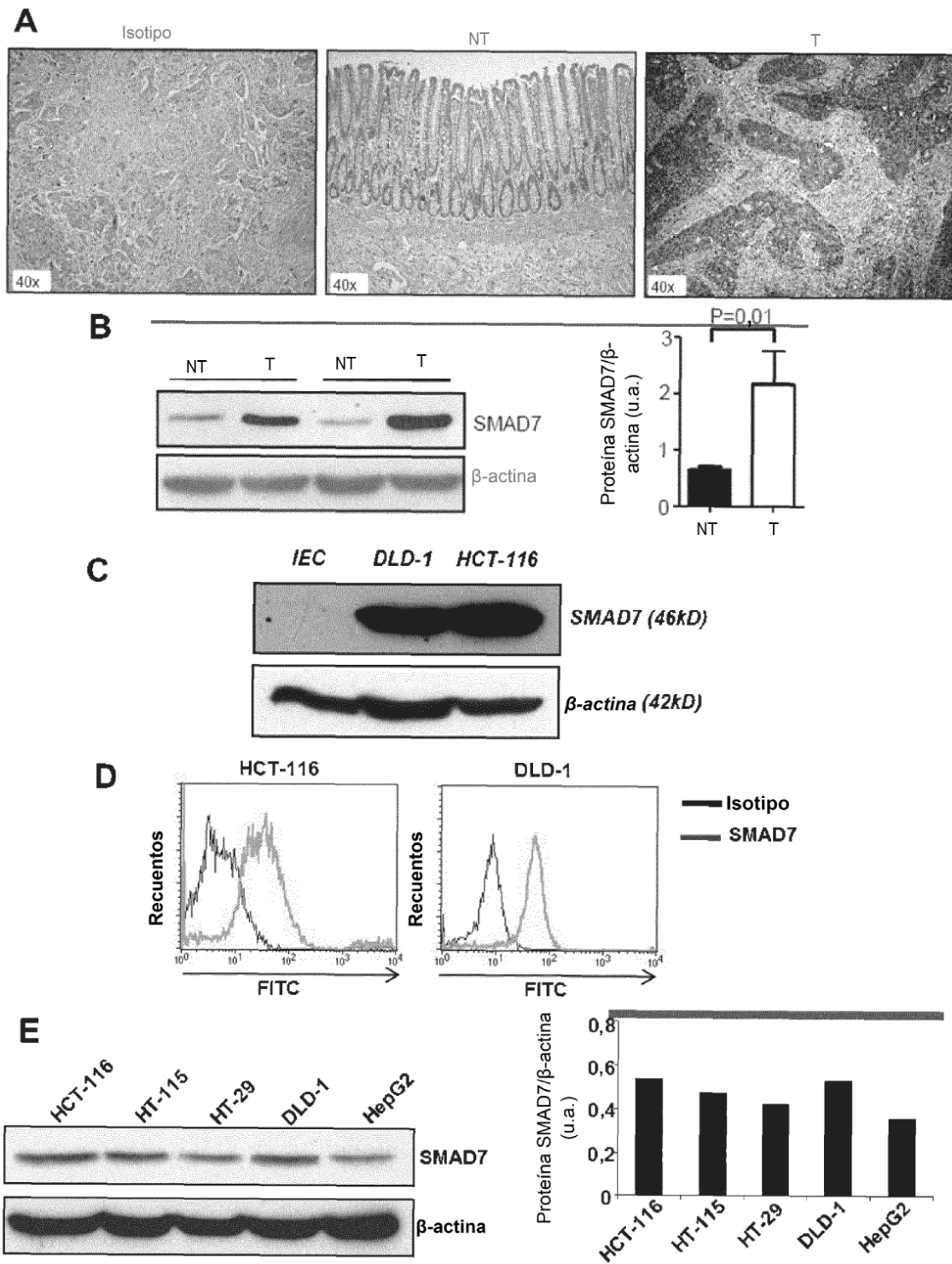


Figura 2

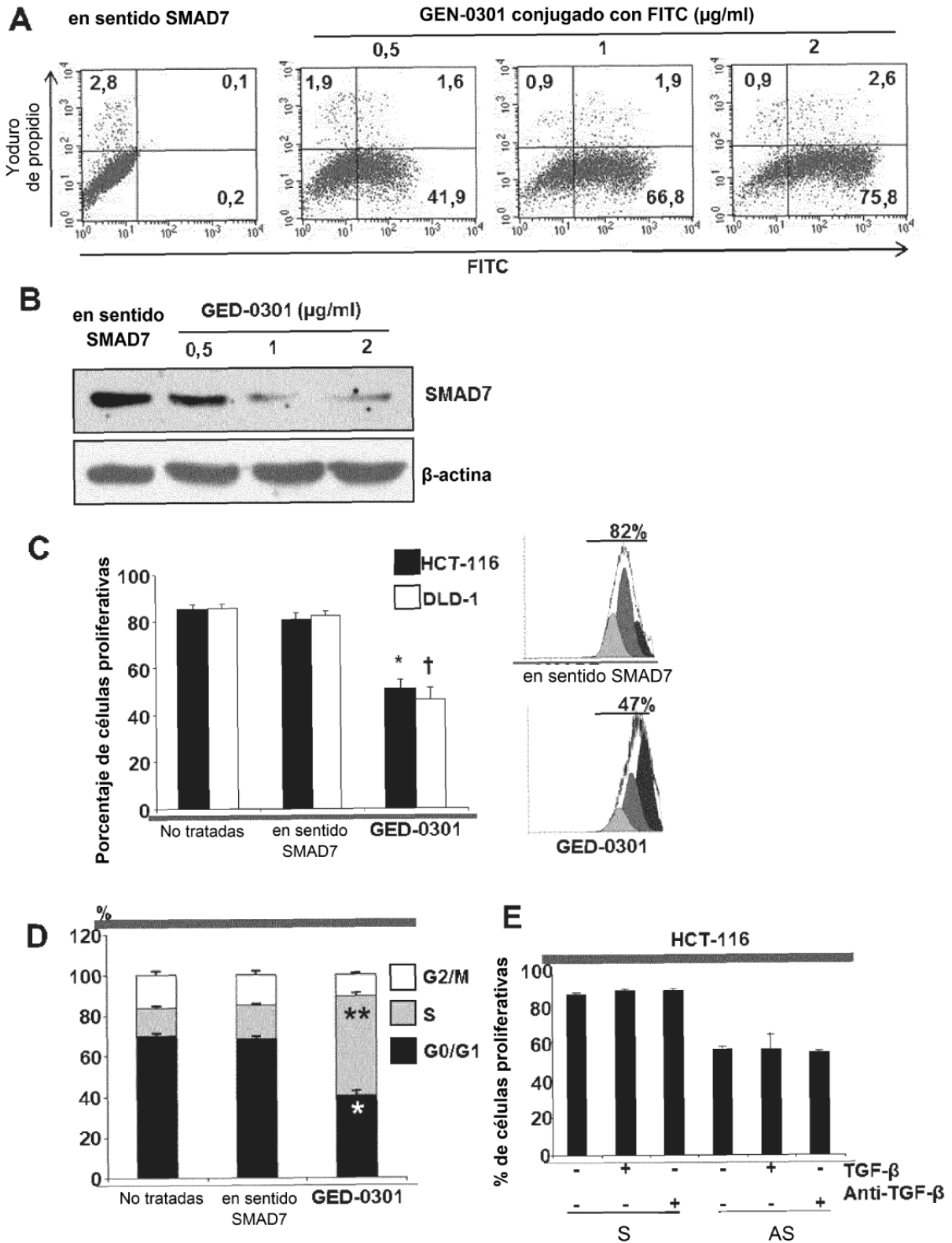


Figura 3

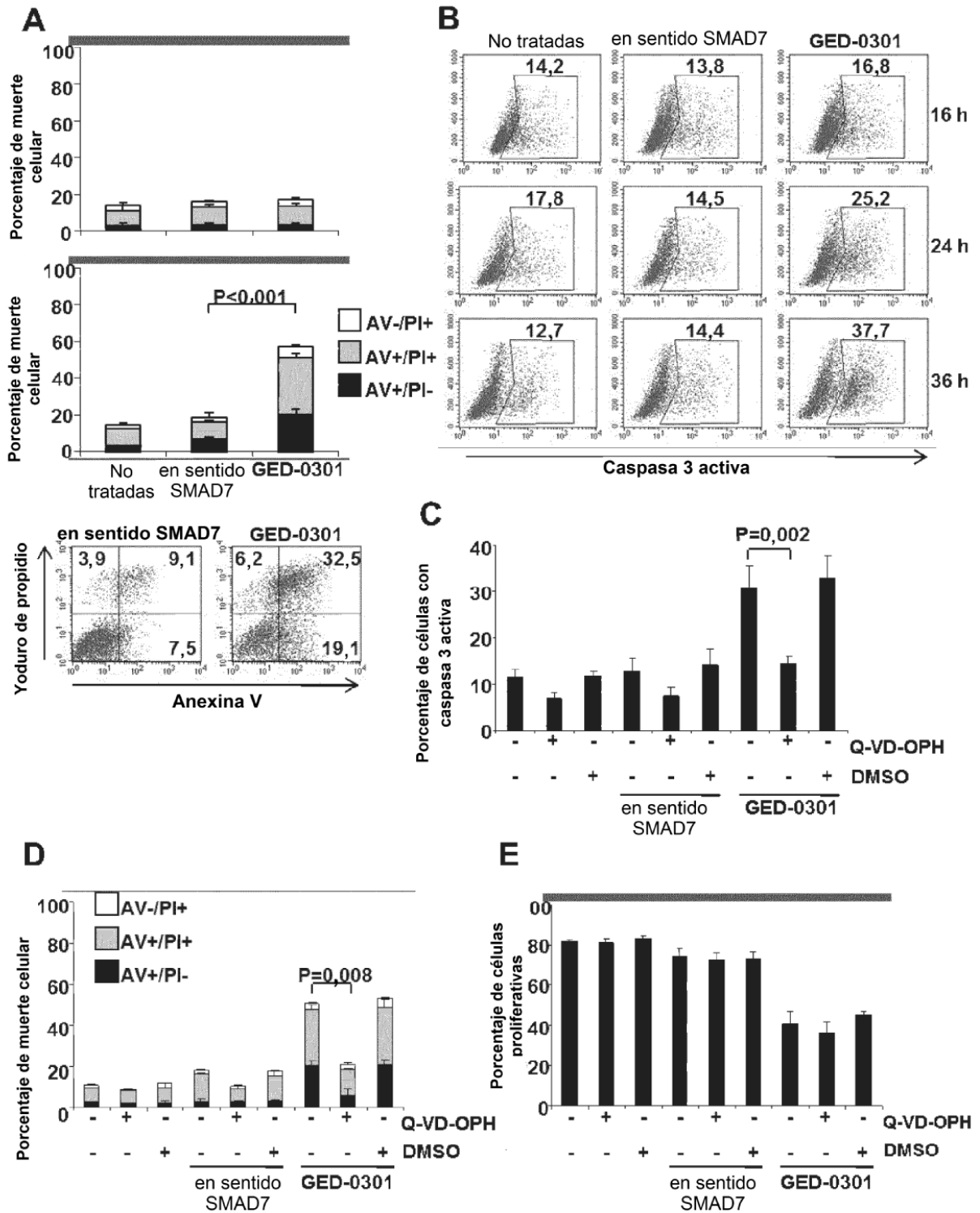


Figura 4

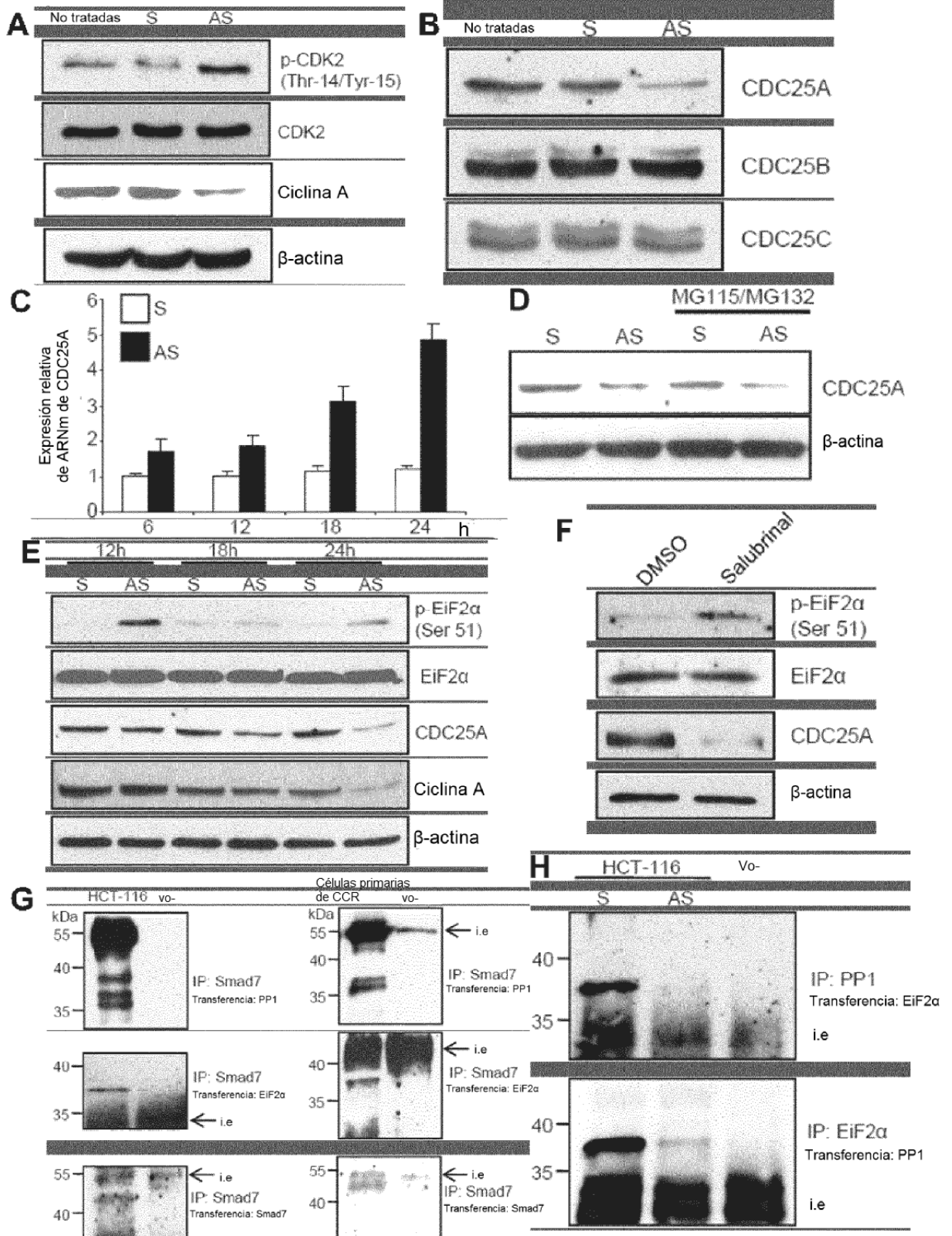
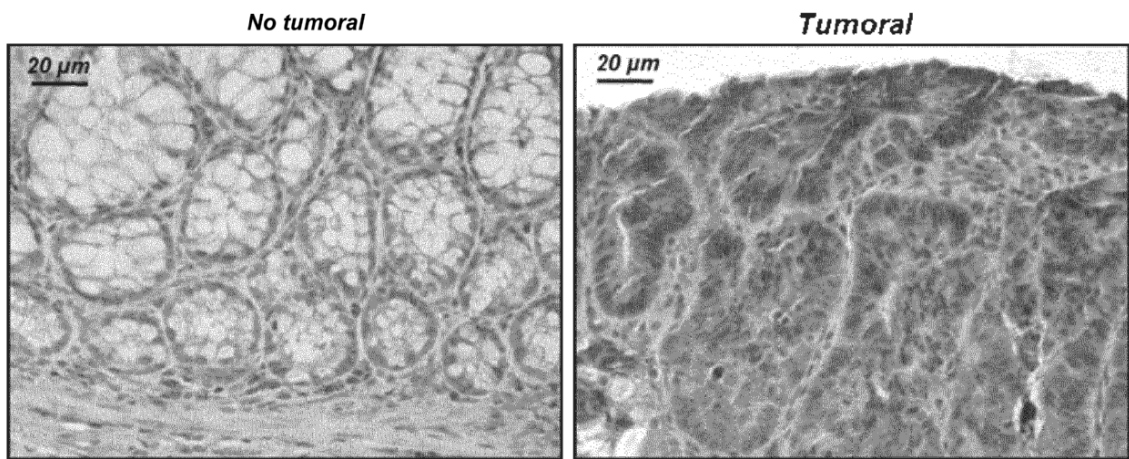


Figura 5

A



B

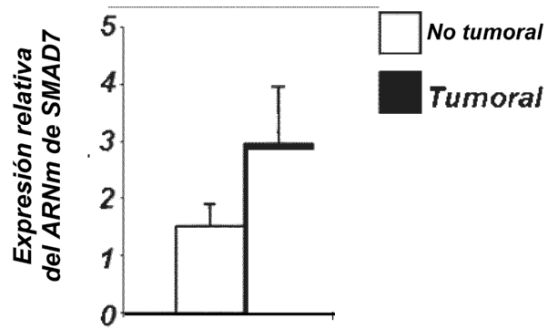


Figura 6

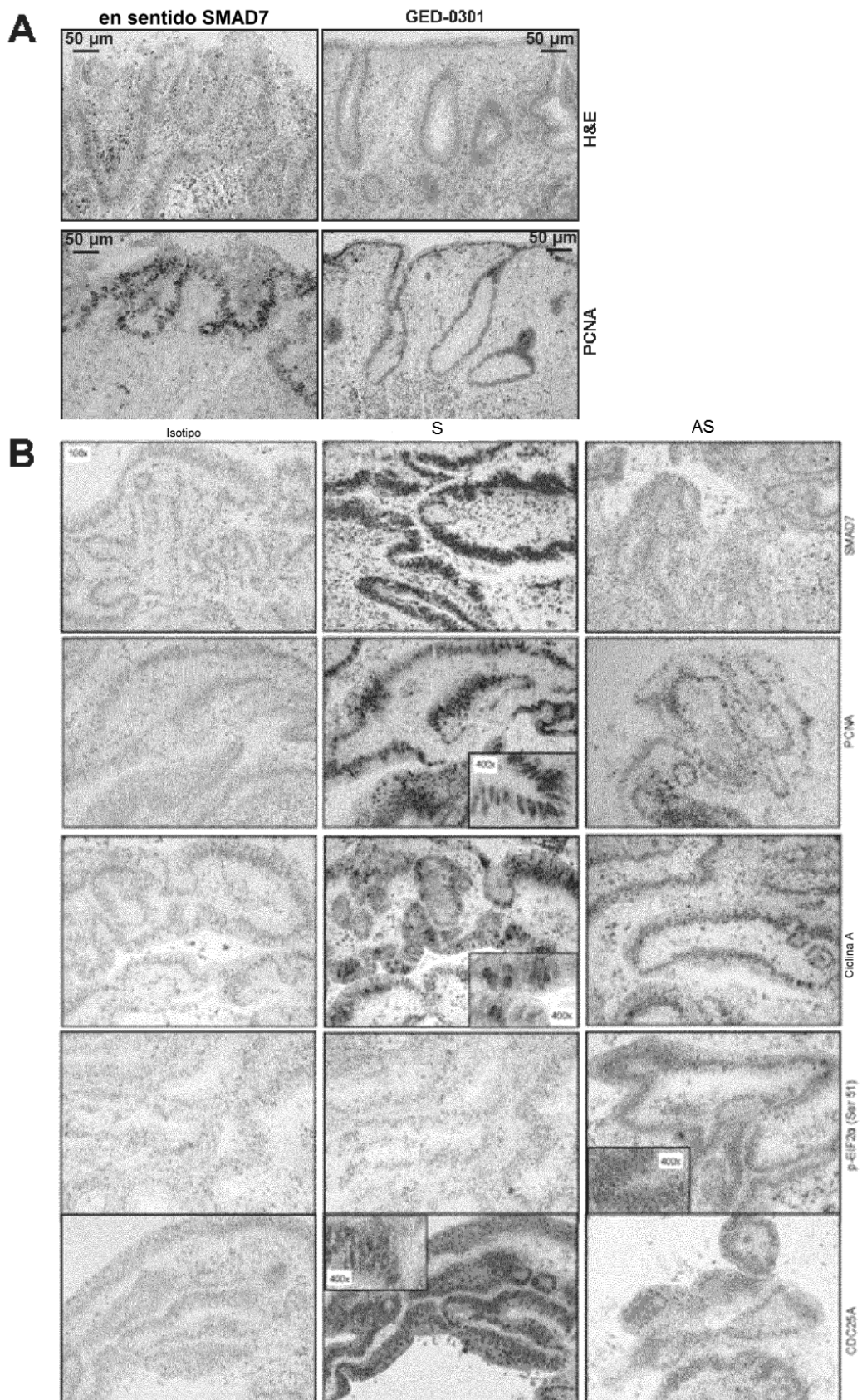


Figura 7

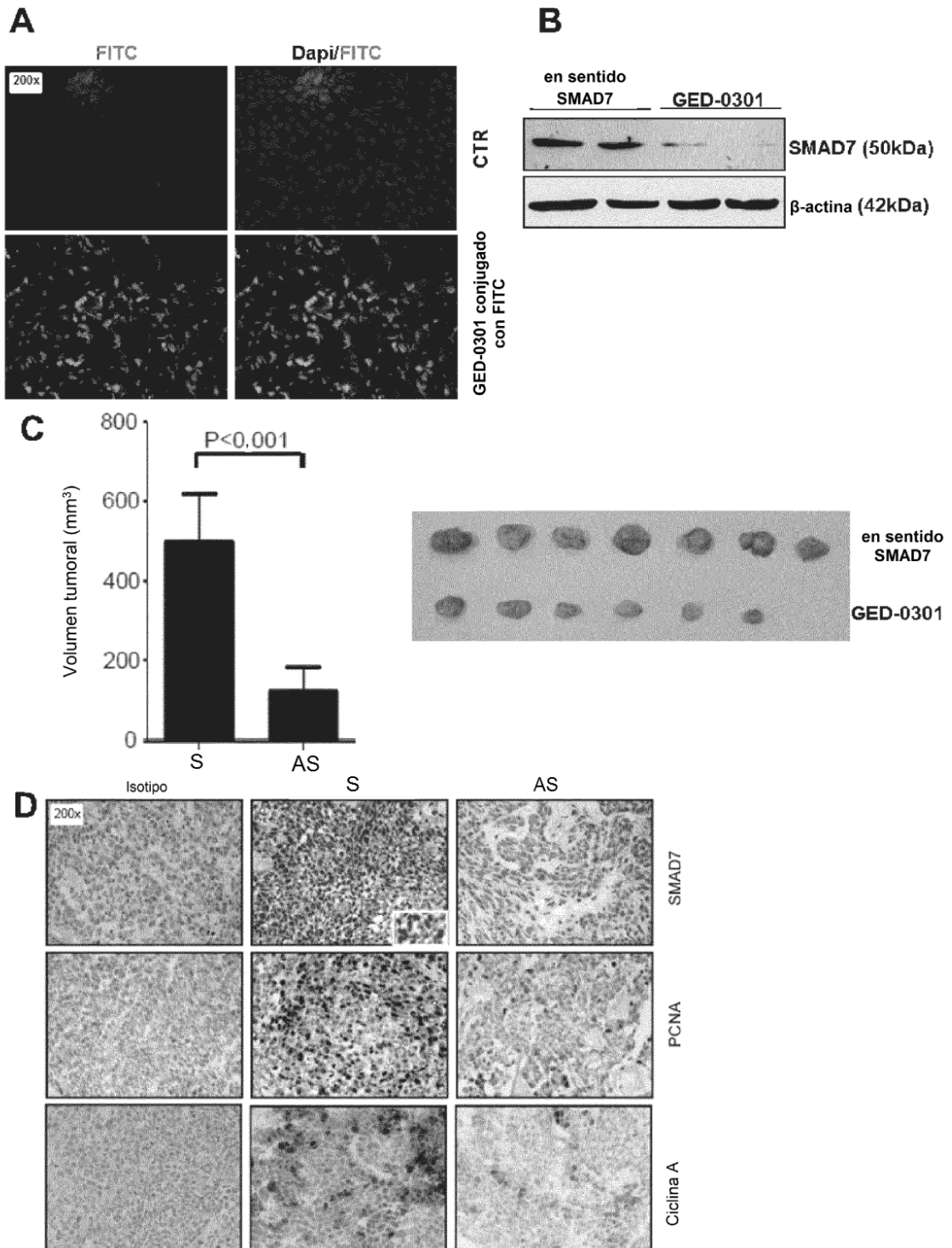


Figura 8

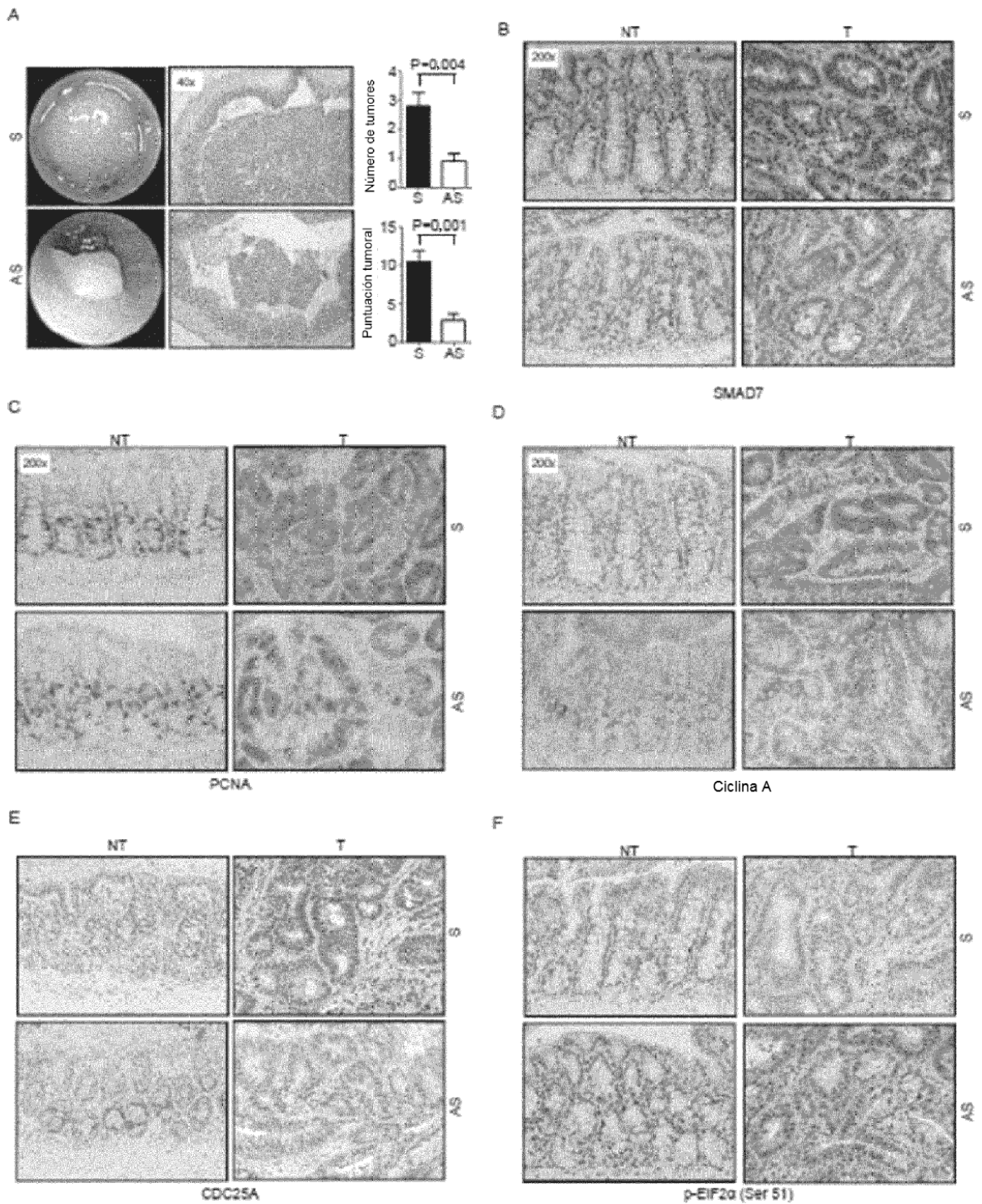
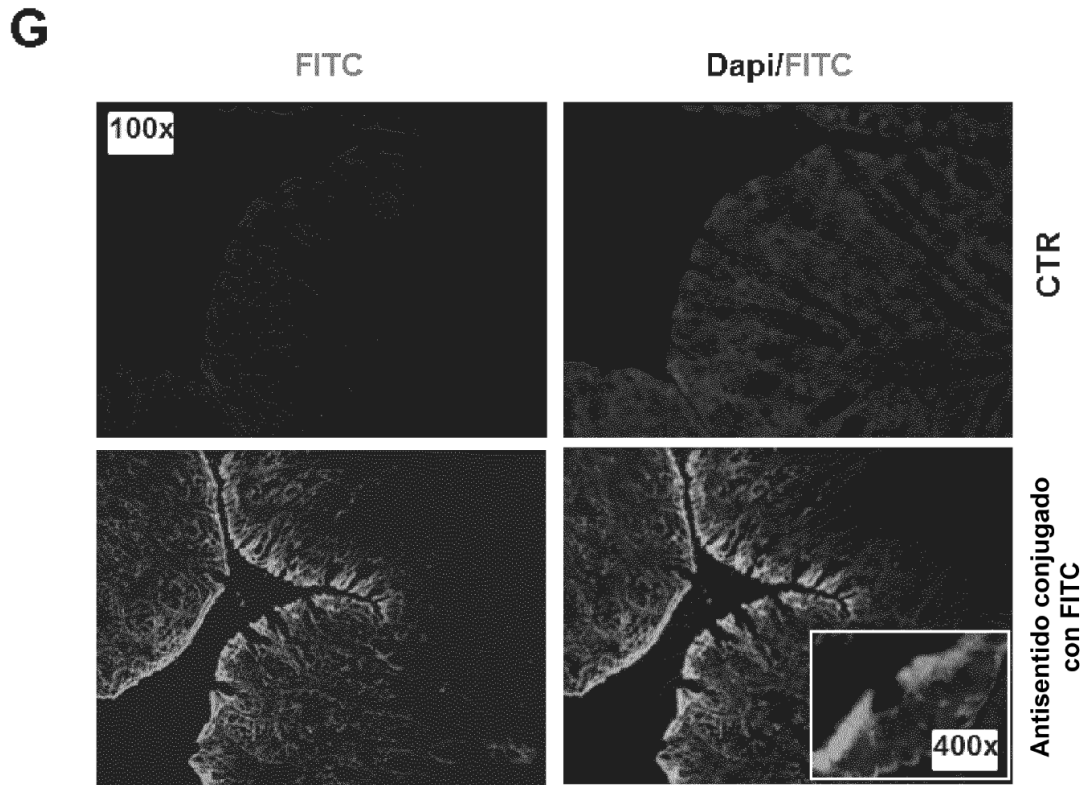


Figura 8



15