

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 557**

51 Int. Cl.:

A61K 47/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2012 E 15182208 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 3011974**

54 Título: **Nanopartículas conjugadas a un agente antinucleolina**

30 Prioridad:

02.06.2011 US 201161492683 P

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

21.11.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
300 East Market Street, Suite 300
Louisville, KY 40202, US**

72 Inventor/es:

**BATES, PAULA J;
MALIK, MOHAMMAD TARIQ y
KANG, KYUNG A**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 690 557 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

Nanopartículas conjugadas a un agente antinucleolina

5 INVESTIGACIÓN O DESARROLLO FINANCIADO FEDERALMENTE

[0001] La presente invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo la subvención No. W81XWH-10-1-0053 otorgada por el Departamento de Defensa, Investigación Médica del Ejército de los EE.UU. El Gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 ANTECEDENTES

[0002] La nucleolina [8] es una proteína abundante no ribosomal del nucleolo, el sitio de transcripción génica ribosomal y el empaquetado del ARN pre-ribosomal. Esta fosfoproteína de 710 aminoácidos tiene una estructura de múltiples dominios que consiste en un N-terminal de tipos histona, un dominio central que contiene cuatro motivos de reconocimiento de ARN y un extremo C-terminal rico en glicina/arginina, y tiene un peso molecular aparente de 110 kD. Mientras que la nucleolina se encuentra en cada célula nucleada, la expresión de nucleolina en la superficie celular se ha correlacionado con la presencia y agresividad de las células neoplásicas [3].

[0003] La correlación de la presencia de la nucleolina de la superficie celular con células neoplásicas se ha utilizado para métodos para determinar el estado neoplásico de las células mediante la detección de la presencia de nucleolina en la membrana plasmática [3]. Esta observación también ha proporcionado nuevas estrategias de tratamiento del cáncer basadas en la administración de compuestos que reconocen específicamente nucleolina [4].

[0004] Los aptámeros de ácido nucleico son oligonucleótidos sintéticos cortos que se pliegan en estructuras tridimensionales únicas que pueden ser reconocidas por proteínas diana específicas. Por lo tanto, su mecanismo de reconocimiento es similar a los anticuerpos monoclonales, pero pueden tener ventajas sustanciales sobre estos, incluyendo una depuración más rápida *in vivo*, mejor penetración en el tumor, no inmunogenicidad, y síntesis y almacenamiento más fáciles.

[0005] Los oligonucleótidos ricos en guanosa (GRO) diseñados para la formación de triple hélice son conocidos por unirse a nucleolina [5]. Se ha sugerido que esta capacidad de unirse a nucleolina causa su capacidad inesperada de efectuar una antiproliferación de células de carcinoma de próstata cultivadas [6]. Los efectos antiproliferativos no son consistentes con un mecanismo mediado por triple hélice o un antisentido, y es evidente que los GRO inhiben la proliferación mediante un modo de acción alternativo. Se ha supuesto que GROs, que muestran la propensión a formar estructuras de orden superior que contienen cuartetos de G, trabajan mediante un mecanismo de aptámero que implica la unión a nucleolina debido a un reconocimiento específico de forma de la estructura de GRO; la unión a la nucleolina de la superficie celular induce a continuación a la apoptosis. Los efectos antiproliferativos de GRO se han demostrado en líneas celulares derivadas de carcinomas de próstata (DU145), mama (MDA-MB-231, MCF-7), o cervical (HeLa) y se correlacionan con la capacidad de GRO de unirse a la superficie celular de nucleolina [6].

[0006] AS1411, un aptámero de ADN GRO de unión a nucleolina que tiene actividad antiproliferativa contra las células cancerosas con poco efecto sobre las células no malignas, se ha desarrollado previamente. La captación de AS1411 parece tener lugar mediante macropinocitosis en las células cancerosas, pero por una vía no macropinocítica en las células no malignas, dando como resultado la destrucción selectiva de las células cancerosas, sin afectar a la viabilidad de las células no malignas [9]. AS1411 fue el primer aptámero contra el cáncer probado en seres humanos y los resultados de los ensayos clínicos de AS1411 (incluyendo estudios de fase II en pacientes con carcinoma de células renales o leucemia mieloide aguda) indican una actividad clínica prometedora, sin evidencia de efectos secundarios graves. A pesar de los prometedores resultados clínicos de los estudios de fase II, AS1411 no funcionó como se esperaba en los estudios de Fase IIB, posiblemente debido a la baja potencia de AS1411.

[0007] Winer I et al. (2010) Cancer Research 70 (21) 8674-8683 describe cisplatino encapsulado dentro de una matriz de ácido poliacrílico para formar una nanopartícula, y el uso de la proteína F3 para dirigir estas nanopartículas a tumores. Hwang D. et al. (2010) The Journal of Nuclear Medicine 51 98-105 da a conocer una sonda de formación de imágenes para el cáncer, que comprende el aptámero AS1411 sintetizado con una nanopartícula magnética de cobalto-ferrita, rodeada de rodamina fluorescente con una matriz con sílice en la cubierta. El documento US 2011/091373 se refiere a la destrucción selectiva de células malignas con terapia fotodinámica, en la que las nanopartículas de ácido poliacrílico que contienen fotosensibilizadores están dirigidos a la nucleolina por la proteína F3. El documento US 2011/111002 utiliza nanopartículas de oro como vectores para el transporte y la liberación de glutatión en las células humanas.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0008] La presente invención se define según las reivindicaciones.

[0009] De este modo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento del cáncer, que comprende: un agente antinucleolina conjugado a nanopartículas y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que: las nanopartículas comprenden oro; el agente antinucleolina comprende AS1411; y el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, linfoma, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cuello uterino y de hepatoma.

[0010] En una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende además un colorante de cianina.

[0011] En una realización, las nanopartículas en la composición farmacéutica de la invención tienen un diámetro promedio de 1 a 50 nm; opcionalmente un diámetro promedio de 1 a 20 nm.

[0012] En una realización, la composición farmacéutica de la invención es para utilizar en el tratamiento del cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer de pulmón.

[0013] En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de la invención, en la que se administra un segundo tratamiento contra el cáncer seleccionado del grupo que consiste en vinorelbina, mitomicina, camptotecina, ciclofosfamida, metotrexato, citrato de tamoxifeno, 5-fluorouracilo, irinotecan, doxorubicina, flutamida, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, mesilato de imatinib, antraciclina, letrozol, trióxido de arsénico, anastrozol, pamoato de triptorelina, ozogamicina, clorhidrato de irinotecán, BCG vivo, implante de acetato de leuprolide (Viadur), bexaroteno, exemestano, clorhidrato de topotecan, gemcitabina HCl, clorhidrato de daunorubicina, citrato de toremifeno (Fareston), carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y cualquier otro fármaco oncológico que contiene platino, trastuzumab, lapatinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab, temsirolimus, everolimus, vandetanib, vemurafenib, crizotinib, vorinostat, bevacizumab, terapia de radiación, hipertermia, terapia génica y terapia fotodinámica.

[0014] La descripción proporciona una composición que comprende un agente antinucleolina conjugado a nanopartículas, en la que las nanopartículas son no magnéticas.

[0015] También se describe un agente para la formación de imágenes, que comprende una composición farmacéutica de la presente invención (o composición de la descripción) y un portador farmacéuticamente aceptable. También se describe un procedimiento de obtención de imágenes del cáncer *in vivo*, que comprende administrar el agente de formación de imágenes de la descripción, a un sujeto y formar una imagen del agente de imagen presente en el sujeto.

DEFINICIONES

[0016] El término "conjugado" significa "unido químicamente a".

[0017] El término "oligonucleótidos antinucleolina" se refiere a un oligonucleótido que se une a nucleolina.

[0018] El término "GI50" se refiere a las concentraciones necesarias para alcanzar el 50% de inhibición del crecimiento celular. Los valores de GI50 pueden determinarse por un ensayo de proliferación/citotoxicidad celular (MTT), descrito por Morgan [23], Girvan et al. [19] y Mosmann [20].

[0019] El término "concentración de aptámero equivalente" se refiere a la concentración de oligonucleótido antinucleolina presente en el conjugado.

[0020] Los tumores y cánceres incluyen, cambios de tejido disproliferativos sólidos y tumores difusos. Ejemplos de tumores y cánceres incluyen melanoma, linfoma, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cuello uterino, hepatoma, y otros neoplasmas. Para más ejemplos de tumores y cánceres, véase, por ejemplo, Stedman [1].

[0021] "Tratar un tumor" o "tratar un cáncer" significa inhibir significativamente el crecimiento y/o metástasis del tumor o cáncer. La inhibición del crecimiento puede indicarse por el menor volumen del tumor o menor aparición de metástasis. El crecimiento del tumor se puede determinar, por ejemplo, mediante el examen del volumen del tumor a través de procedimientos de rutina (por ejemplo, la obtención de mediciones bidimensionales con un calibrador de línea). La metástasis se puede determinar mediante la inspección de las células tumorales en sitios secundarios o examinando el potencial metastásico de las células tumorales biopsiadas *in vitro*.

[0022] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico que puede ser utilizado con eficacia para tratar el cáncer en seres humanos.

[0023] Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción que son compatibles con la administración farmacéutica. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen agua, solución salina, soluciones de Ringer y solución de dextrosa. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

[0024] "Medicamento", "composición terapéutica" y "composición farmacéutica" se utilizan indistintamente para indicar un compuesto, la materia, mezcla o preparación que ejerce un efecto terapéutico en un sujeto.

[0025] "Anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y se refiere a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos modificados químicamente, en los que la modificación química no interfiera sustancialmente con la selectividad y especificidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0026] Un "agente antinucleolina" incluye cualquier molécula o compuesto que interactúa con la nucleolina. Tales agentes incluyen, por ejemplo, anticuerpos antinucleolina, aptámeros, tales como GRO y proteínas de reconocimiento de nucleolina. Los agentes antinucleolina utilizados en la invención comprenden AS1411.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027]

La Figura 1A es un gráfico del volumen del tumor de los tumores de xenoinjerto *in vivo* en ratones desnudos tratados con diversos agentes, mientras que la Figura 1B es un gráfico de la media de peso corporal de los mismos ratones durante el tratamiento.

Las figuras 2A y 2B son imágenes de dos ratones de xenoinjerto MDA231 inyectados por retro-orbital con aproximadamente 200 ng/100 μ l de AS1411-Cy5-GNP o CRO-Cy5-GNP. La imagen fue adquirida mediante un PHOTON IMAGER® después de 2 horas (A) y 6 horas (B) después de la inyección.

Las Figuras 3A-D muestran el efecto sobre la proliferación celular de diferentes concentraciones de una de las composiciones indicadas, o sin tratamiento (NT), usando un ensayo de MTT. Las células se sembraron en placa de 96 pocillos a una densidad de 1000 células/pocillo. Las células se trataron con la concentración diferente de AS1411 y AS1411-GNP durante cinco días.

Las figuras 4A-D son micrografías ópticas de células MCF7 tratadas por tinción de mejora de plata para nanopartículas de oro, que ilustran la acumulación comparativa de nanopartículas de oro después de la administración de la composición indicada, o sin la administración.

La figura 5 son micrografías electrónicas de células MDA231 después de la administración de un oligonucleótido de control (Figura 5A) o de partículas oro conjugadas a oligonucleótido de control (Figura 5B), o AS1411 (Figura 5C), o nanopartículas de oro conjugadas a AS1411 (Figura 5D).

Las Figuras 6A-D son imágenes de microscopía confocal de células MCF7 después la administración de un oligonucleótido de control (Figura 6A) o de partículas oro conjugadas a oligonucleótido de control (Figura 6C), o AS1411 (Figura 6B), o nanopartículas de oro conjugadas a AS1411 (Figura 6D).

La Figura 7 son imágenes de microscopía fluorescente de células MCF7 después de 5 días de la administración de un oligonucleótido de control, AS1411-Cy5, GNP no conjugado, partículas de oro conjugadas a oligonucleótido de control, nanopartículas de oro conjugadas a AS1411-Cy5 y células no tratadas.

La Figura 8 son imágenes de microscopía fluorescente de las células MDA231 después de 5 días de la administración de un oligonucleótido de control, GNP no conjugado, partículas de oro conjugadas a oligonucleótido de control, AS1411-Cy5, nanopartículas de oro conjugadas a AS1411-Cy5 y células no tratadas.

La figura 9A es un esquema de diferentes enlazadores utilizados para conjugar AS1411/CRO a nanopartículas de oro, y la figura 9B es un esquema de unión y desunión de los aptámeros a las nanopartículas de oro.

La Figura 10 muestra el resultado de un ensayo de proliferación/citotoxicidad celular (MTT): Las células MDA-231 se trataron con los diversos agentes durante 72 horas a 200 nM de concentración de aptámero equivalente. Para la comparación, se utilizaron AS1411 y CRO solos a una concentración de 10 μ M.

Las Figuras 11A-G son gráficos de los ensayos de citometría de flujo de células MDA-231 teñidas con PI y Anexina V: (A) las células no tratadas (muestra de control); (B) las células tratadas con AS1411 (a una concentración de 10 μ M) durante 72 horas; (C) las células tratadas con oligonucleótido de control CRO; (D) las células tratadas con nanopartículas de oro no conjugadas; (E) las células tratadas con el GNP-AS1411 (a concentración de aptámero equivalente de 200 nM); (F) las células tratadas con el control de GNP-CRO (a concentración aptámero equivalente

de 200 nM); (G) células de control positivas tratadas con camptotecina (a una concentración de 6 µg/ml durante 20 horas).

La figura 12 muestra imágenes de ratones tratados mediante inyección intraperitoneal con GNP-AS1411-Cy5 (concentración de aptámero equivalente de 1 mg/kg), AS1411-Cy5 (10 mg/Kg) y el GNP-CRO-Cy5 (concentración aptámero equivalente de 1 mg/kg) y GNP-Cy5, y la obtención de imágenes después de 96 horas.

Las Figuras 13A y B muestran la biodistribución de AS1411-GNP-Cy5: los ratones fueron tratados, sacrificados y se fotografiaron los órganos (A) y se examinaron para analizar la fluorescencia (B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0028] La presente invención hace uso del descubrimiento de que los agentes antinucleolina, conjugados a partículas, tales como aptámero conjugado a nanopartículas de oro, tienen un efecto antiproliferativo sobre el cáncer y tumores. Además, el aptámero conjugado a nanopartículas de oro en particular, tiene un efecto antiproliferativo similar o mayor que el aptámero (oligonucleótido antinucleolina) por sí solo, demostrando efectos similares a solo de 1/10 a 1/100 de la dosis. Además, estos mismos agentes, que tienen preferiblemente un colorante fluorescente conjugado a la partícula o unida al agente antinucleolina, también se pueden usar también como agentes de obtención de imágenes, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

[0029] Los agentes antinucleolina incluyen (i) aptámeros, tales como GRO; (ii) anticuerpos antinucleolina; y (iii) proteínas que reconocen nucleolina. Ejemplos de aptámeros incluyen oligonucleótidos ricos en guanina (GRO). Ejemplos de oligonucleótidos y ensayos adecuados se proporciona también en Miller et al. [7]. Las características de GRO incluyen:

- (1) que tienen al menos 1 motivo GGT,
- (2) que tienen preferiblemente 4-100 nucleótidos, aunque GRO que tienen muchos más nucleótidos son posibles,
- (3) que tienen opcionalmente modificaciones químicas para mejorar la estabilidad.

[0030] Los GRO especialmente útiles forman estructuras de cuarteto de G, tal como se indica por un perfil de desnaturalización/renaturalización térmica reversible a 295 nm [6]. Los GRO preferidos también compiten con un oligonucleótido de telómero para la unión a una proteína celular diana en un ensayo de desplazamiento por movilidad electroforética [6]. En algunos casos, la incorporación de los nucleótidos GRO en secuencias de ácidos nucleicos más grandes puede ser ventajosa; por ejemplo, para facilitar la unión de un ácido nucleico de GRO a un sustrato sin desnaturalizar el sitio de unión a nucleolina. Los ejemplos de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 1; los oligonucleótidos preferidos incluyen las SEQ ID NOS: 1-7; 9-16; 19-30 y 31 de la Tabla 1.

Tabla 1. Gros no antisentido que se unen nucleolina y controles que no se unen^{1,2,3}.

GRO	Secuencia	SEQ ID NO:
GRO29A ¹	tttggtggtg gtggttggtg tgggtggtg	1
GRO29-2	tttggtggtg gtggttttgg tgggtggtg	2
GRO29-3	tttggtggtg gtggtggtg tgggtggtg	3
GRO29-5	tttggtggtg gtggtttggg tgggtggtg	4
GRO29-13	tgggtggtg ggt	5
GRO14C	ggtggtggtg gtgg	6
GRO15A	gtgtttggg gtggt	7
GRO15B ²	ttgggggggg tgggt	8
GRO25A	ggttgggggtg ggtgggggtg gtggg	9
GRO26B ¹	ggtggtggtg gttgtggtg tgggtg	10
GRO28A	tttggtggtg gtggttggtg tgggtggtg	11
GRO28B	tttggtggtg gtggttggtg ggtggtg	12
GRO29-6	ggtggtggtg gttgtggtg tgggtggtt	13
GRO32A	ggtggttggtg gtggttggtg tgggtggtg gg	14
GRO32B	tttggtggtg gtggttggtg tgggtggtg tt	15
GRO56A	ggtggtggtg gttgtggtg tgggtggtg ggtggtggtg gttgtggtg tgggtg	16
CRO	ttctctctc ctccttctc tcctctctc	18
GRO A	ttaggggttag ggttaggggt aggg	19
GRO B	ggtggtggtg g	20
GRO C	ggtggttggtg gtgg	21
GRO D	ggtggttggtg gttgg	22
GRO E	gggttttggg	23
GRO F	ttggttttgg ggttttgggt	24
GRO G ¹	ggtggttggtg gttgg	25

GRO H ¹	ggggttttgg	26
GRO I ¹	gggttttggg	27
GRO J ¹	ggggttttgg ggtttggggg tttggggg	28
GRO K ¹	ttgggggttg ggtgggggtt gggg	29
GRO L ¹	gggtgggttg gtgggt	30
GRO M ¹	ttggttttgg ggtttgggtt ttttgg	31
GRO N ²	tttcctctc ctcctctcc tcctcctcc	32
GRO O ²	cctcctctc cttcctcc tcctcc	33
GRO P ²	tgggggt	34
GRO Q ²	gcatgct	35
GRO R ²	gcggtttgcg g	36
GRO S ²	tagg	37
GRO T ²	ggggttgggg tgtgggggtg	38

¹Indica un buen GRO que se une a nucleolina de membrana plasmática. ²Indica un control de nucleolina (unión a nucleolina no de membrana plasmática). ³Secuencias de GRO sin las denominaciones ¹ o ² tienen cierta actividad antiproliferativa.

[0031] También se puede usar cualquier anticuerpo que se une a nucleolina. En ciertos casos se prefieren anticuerpos monoclonales ya que se unen a epítopos individuales, específicos y definidos. En otros casos, sin embargo, se pueden usar anticuerpos policlonales capaces de interactuar con más de un epítipo en la nucleolina. Muchos anticuerpos antinucleolina están disponibles comercialmente, y de cualquier forma, se fabrican fácilmente. La Tabla 2 enumera unos cuantos anticuerpos antinucleolina disponibles comercialmente.

Tabla 2: Anticuerpos antinucleolina disponibles comercialmente

Anticuerpo	Fuente	Fuente de antígeno
Anticuerpo monoclonal (mAb) de ratón p7-1A4	Developmental Studies Hybridoma Bank	Oocitos de <i>Xehopus laevis</i>
mAb de ratón Sc-8031	Santa Cruz Biotech	Humana
Ab policlonal (pAb) de cabra Sc-9893	Santa Cruz Biotech	Humana
pAb de cabra Sc-9892	Santa Cruz Biotech	Humana
mAb de ratón clon 4E2	MBL International	Humana
mAb de ratón clon 3G4B2	Upstate Biotechnology	Perro (células MDCK)
Nucleolina, humana (mAb de ratón)	MyBioSource	Humana
Antinucleolina-Fosfo purificado, Thr76/Thr84 (mAb de ratón)	BioLegend	Humana
Anticuerpo policlonal de Nucleolina de Conejo	Novus Biologicals	Humana
Nucleolina (NCL, C23, FLJ45706)	US Biological	Humana
FLJ59041, Proteína C23, mAb Mo xHu		Humana
Nucleolina (NCL, Nucl, C23, FLJ45706, Proteína C23) Pab Rb xHu	US Biological	Humana
mAb antinucleolina humana Fosfo-Thr76/Thr84 de ratón, clon 10C7	Cell Sciences	Humana
Anti-NCL / Nucleolina (pAb)	LifeSpan Biosciences	Humana
Anticuerpo policlonal de ratón MaxPab purificado de NCL (B02P)	Abnova	Humana
Anticuerpo policlonal de conejo MaxPab purificado de NCL (D01 P)	Abnova	Humana
Anticuerpo monoclonal de NCL, clon 10C7 (mAb de ratón)	Abnova	Humana
Anticuerpo monoclonal de nucleolina (4E2) (mAb de ratón)	Enzo Life Sciences	Humana
Nucleolina, Anticuerpo Monoclonal de Ratón	Life Technologies Corporation	Humana
Anticuerpo de NCL (Centro E443) (pAb de conejo)	Abgent	Humana
Antinucleolina, clon 3G4B2 (mAb de ratón)	EMD Milipore	Humana
NCL (pAb de conejo)	Proteintech Group	Humana
Anticuerpo Monoclonal Antinucleolina de Ratón, sin conjugar, clon 3G4B20	Active Motif	Humana
Nsr1p – monoclonal de ratón	EnCor Biotechnology	Humana
Nucleolina (mAb de ratón)	Thermo Scientific Pierce Products	Humana
Anticuerpo [4E2] de nucleolina (mAb de ratón)	GeneTex	Humana

[0032] Las proteínas de reconocimiento de nucleolina son proteínas, diferentes de anticuerpos, que se unen específicamente a nucleolina. Los ejemplos incluyen la proteína ribosomal S3, péptidos F3 de migración tumoral [26, 27] y la miosina H9 (una miosina no muscular que se une a la nucleolina de la superficie celular de las células endoteliales en vasos angiogénicos durante la tumorigénesis).

[0033] Los agentes antinucleolina se pueden conjugar a partículas fabricadas de una variedad de materiales, materiales sólidos, incluyendo (1) metales y elementos; (2) óxidos; (3) semiconductores; y (4) polímeros. Los metales y elementos, preferiblemente metales y elementos no magnéticos, incluyen oro, plata, paladio, iridio, platino y aleaciones de los mismos; los elementos incluyen silicio, boro y carbono (tales como diamante, grafeno y nanotubos de carbono), y compuestos sólidos de los mismos. Los óxidos incluyen dióxido de titanio, dióxido de silicio, óxido de zinc, óxido de hierro, óxido de circonio, óxido de magnesio, óxido de aluminio y óxidos complejos de los mismos, tales como titanato de bario. Los semiconductores incluyen puntos cuánticos, sulfuro de zinc, aleaciones de silicio/germanio, nitruro de boro, nitruro de aluminio, y soluciones sólidas de los mismos. Los polímeros incluyen polietilenos, poliestirenos, poliacrilamida, poliacrilatos y polimetacrilatos, y polisiloxanos. Preferiblemente, las partículas son no tóxicas. Las partículas son preferiblemente nanopartículas que tienen un diámetro promedio de partícula de 1-100 nm, más preferiblemente 1-50 nm, incluyendo 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 nm.

[0034] Los oligonucleótidos y las proteínas se han unido a materiales sólidos, tales metales y elementos, óxidos, semiconductores y polímeros, mediante una variedad de técnicas. Estas mismas técnicas se pueden utilizar para unir agentes antinucleolina a partículas. La unión adicional de colorantes a las nanopartículas conjugadas a agente antinucleolina (conjugados), tales como colorantes de cianina, permite utilizar los conjugados como agentes de obtención de imágenes, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

[0035] Se pueden utilizar nanopartículas conjugadas a agente antinucleolina para formular una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer y tumores, y el reconocimiento de células cancerosas que expresan nucleolina de la superficie celular, mediante la formación de mezclas de las nanopartículas conjugadas a agente antinucleolina y un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una composición farmacéutica. Los métodos de tratamiento de cáncer en un sujeto incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nanopartículas conjugadas a agente antinucleolina.

[0036] Las composiciones particularmente preferidas son aptámeros conjugados a nanopartículas de oro. Las nanopartículas de oro (GNP) exhiben una baja toxicidad, química de superficie versátil, ligeras propiedades de absorción/dispersión y tamaño ajustable. Los aptámeros seleccionan eficazmente partículas de oro y evitan la agregación, son seguros, estables, fáciles de sintetizar, y no inmunogénicos. Los aptámeros conjugados a GNP ofrecen muchas ventajas sobre estrategias alternativas, tales como una mayor actividad antiproliferativa en células de cáncer sobre AS1411 solo y una mejor eficacia *in vivo*, que provocan la regresión de durable de xenoinjerto de cáncer de mama establecido en ratones, sin evidencia de efectos secundarios. Los aptámeros conjugados a GNP son altamente selectivos para las células de cáncer sobre las células normales, y cuando se unen a colorantes de cianina son excelentes agentes para la obtención de imágenes, por ejemplo Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor 750, IRDye® 680, y IRDye® 800CW (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Los aptámeros conjugados a GNP se pueden usar como un agente de obtención de imágenes, y se pueden administrar como composiciones que contienen además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El agente para la obtención de imágenes se puede administrar a un sujeto en un método de formación de imágenes *in vivo*, para formar una imagen del agente de obtención de imágenes presente en el sujeto.

[0037] Las cantidades y proporciones de las composiciones descritas en el presente documento son en peso, a menos que se indique lo contrario. En consecuencia, el número de agentes antinucleolina por nanopartícula puede variar cuando el peso de la nanopartícula varía, incluso cuando la concentración equivalente de agente antinucleolina (o concentración equivalente de aptámero) es, en cualquier caso, la misma. Por ejemplo, el número de moléculas de agente antinucleolina por nanopartícula puede variar de 2 a 10.000, o 10 a 1000, incluyendo 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900.

[0038] Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su vía de administración prevista, incluyendo administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, inhalación, transdérmica, transmucosa, y rectal. Las soluciones y suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

[0039] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL® (BASF; Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la

composición debe ser estéril y debe ser fluida con el fin de ser administrada usando una jeringa. Dichas composiciones deben ser estables durante la fabricación y almacenamiento y se conservan preferiblemente contra la contaminación de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, poliol (tal como glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y otras mezclas adecuadas compatibles. Los diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal, pueden contener contaminación por microorganismos. Los agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio, pueden incluirse en la composición. Las composiciones que pueden retrasar la absorción incluyen agentes, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

[0040] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación de los agentes activos y otros componentes terapéuticos, en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes según se requiera, seguido de esterilización. Los métodos de preparación de sólidos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles incluyen secado al vacío y liofilización para dar un sólido.

[0041] La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender además otros compuestos terapéuticamente activos, y/o puede utilizarse en conjunción con técnicas físicas tal como se ha señalado en el presente documento que son adecuados para el tratamiento de cánceres y tumores. Los ejemplos de compuestos terapéuticamente activos que se utilizan comúnmente incluyen vinorelbina (Navelbine®), mitomicina, camptotecina, ciclofosfamida (cytoxan®) metotrexato, citrato de tamoxifeno, 5-fluorouracilo, irinotecan, doxorubicina, flutamida, paclitaxel (Taxol®), docetaxel, vinblastina, mesilato de imatinib (Gleevec®), antraciclina, letrozol, trióxido de arsénico (Trisenox®), anastrozol, pamoato de triptorelina, ozogamicina, clorhidrato de irinotecán (Camptosar®), BCG, live (Pacis®), implante de acetato de leuprolide (Viadur), bexaroteno (Targretin®), exemestano (Aromasin®), clorhidrato de topotecan (Hycamtin®), gemcitabina HCl (Gemzar®), clorhidrato de daunorubicina (daunorubicina HCL®), gemcitabina HCl (Gemzar®), citrato de toremifeno (Fareston), carboplatino (Paraplatin®), cisplatino (Platinol® y Platinol-AQ®), oxaliplatino y cualquier otro fármaco oncológico que contiene platino, trastuzumab (Herceptin®), lapatinib (Tykerb®), gefitinib (Iressa®), cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix®), temsirolimus (Torisel®), everolimus (Afinitor®), vandetanib (Zactima®), vemurafenib (Zelboraf®), crizotinib (Xalkori®), vorinostat (Zolinza®), bevacizumab (Avastin®), terapia de radiación, hipertermia, terapia génica y terapia fotodinámica.

[0042] En el tratamiento del cáncer, un nivel de dosificación adecuada del agente terapéutico será generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente por día que se puede administrar en dosis únicas o múltiples. Preferiblemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg por día, de aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg por día, o de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg por día. Dentro de este intervalo, la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, de 0,5 a 5 o de 5 a 50 mg/kg por día. Los compuestos se pueden administrar en un régimen de 1 a 4 veces por día, preferiblemente una o dos veces por día. La administración por infusión continua también es preferible. Todas las cantidades y concentraciones de oligonucleótido de antinucleolina conjugado a nanopartículas de oro se basan en la cantidad o concentración de sólo el oligonucleótido antinucleolina.

[0043] La preparación farmacéutica puede estar preenvasada o en forma lista para administrarse, en cantidades que se corresponden con una sola dosis, adecuadas para una administración única referida como una forma de dosificación unitaria. Las formas de dosificación unitarias se pueden disponer en ampollas, jeringas o viales desechables fabricados de vidrio o plástico.

[0044] Sin embargo, el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular pueden variarse y dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular, y la terapia a la que está sometido el paciente.

EJEMPLOS

[0045] Se sintetizaron nanopartículas de oro unidas a AS1411 para el tratamiento del cáncer y de la obtención de imágenes del cáncer. Los estudios para evaluar la actividad anticancerígena de AS1411 unido a nanopartículas de oro de 5 nm indican que los conjugados han mejorado ampliamente los efectos antiproliferativos sobre las células de cáncer de mama en comparación con AS1411 (SEQ ID NO. 10) solo. El examen microscópico reveló un aumento en la captación en las células de cáncer de mama de GNP-AS1411 en comparación con el GNP solo o GNP conjugado a un oligonucleótido de control. Además, GNP-AS1411 indujo la vacuolización y muerte de células de cáncer de mama, similar a lo observado a concentraciones más altas de AS1411. Los valores de GI50 para AS1411 conjugado a GNP contra células de cáncer de mama se encuentran en el intervalo de 50 a 250 nM, en comparación con el intervalo 1 - 10 uM de AS1411 no conjugado (concentración equivalente de aptámero). Los estudios indican que estos AS1411-GNP presentan una captación selectiva en el tejido tumoral después de la administración sistémica en ratones. Por otra parte, AS1411-GNP mantenía la selectividad de cáncer de AS1411 y no tuvo efecto sobre células no malignas.

[0046] Los estudios piloto *in vivo* en ratones con xenoinjertos de MDA-MB-231 (MDA231) han demostrado que la administración intravenosa de AS1411-GNP a 1 mg/kg/día durante 14 días podría inhibir casi completamente el crecimiento del tumor. Estas actividades estaban relacionadas con aptámero porque los GNP conjugados a ADN de control tenían poca o ninguna actividad, en términos de internalización en las células de cáncer de mama, la captación en xenoinjertos, y los efectos inhibidores sobre las células de cáncer de mama que crecen en cultivo o *in vivo*.

Preparación de aptámeros conjugados a nanopartículas de oro (GNP)

[0047] Los aptámeros AS1411 y CRO (el oligonucleótido de control) con modificación tiol en 5' y/o 3' fluoróforo Cy5 fueron adquiridos de Integrated DNA Technologies (IDT).

AS1411 con enlace tiol en 5': 5'-/5TioMC6-D/TTT TTT GGT GGT GGT GGT TGT GGT GGT GGT GGT TT/-3'.

CRO con enlace tiol en 5': 5'-/5TioMC6-D/TTT TTT CCT CCT CCT CCT TCT CCT CCT CCT TT/-3'.

AS1411 con enlace tiol en 5' y fluoróforo Cy5 en 3': 5'-/5TioMC6-D/TTT TTT GGT GGT GGT GGT TGT GGT GGT GGT TT/Cy5Sp/-3'.

CRO con enlace tiol en 5' fluoróforo Cy5 en 3': 5'-/5TioMC6-D/TTT TTT CCT CCT CCT CCT TCT CCT CCT CCT TT/Cy5Sp/-3'.

[0048] Los extremos tiol de aptámeros se redujo por tri(2-carboxietil) fosfina TECP (50 mM) que es activa a pH ligeramente ácido de 6,5 de solución Tris-EDTA (10 mM) durante 4-8 horas a temperatura ambiente. La solución de aptámeros y TECP se purificó usando columnas NAP-Sephadex G-25. Se adquirieron nanopartículas de oro esféricas precisas de 5 nm de NANOPARTZ y/o TED PELLA INC. Las nanopartículas de oro se filtraron utilizando un filtro de jeringa de 0,5 micras. Las nanopartículas de oro y los aptámeros se mezclaron en la relación molar de 1:40 en 25 ml de agua libre de ARNasa y ADNasa a temperatura ambiente durante la noche. Los reactivos en exceso se eliminaron a continuación por centrifugación a 15.000 rpm durante 20 min, seguido por 3X lavado con agua libre de ARNasa y ADNasa y la centrifugación para eliminar cualquier aptámero no unido. Para cuantificar la cantidad de aptámeros conjugados en la superficie de nanopartículas, el aptámero conjugado a GNP se incubó en DTT 0,1 M a temperatura ambiente, seguido de la separación de las GNP por centrifugación. El sobrenadante se diluyó y se midió espectrofotométricamente (A260nm), calculando a continuación la concentración a partir de la curva de dilución estándar de aptámeros o mediante espectrofotómetro UV-VIS NanoDrop 2000. Del mismo modo, la concentración de las nanopartículas de oro se calculó usando la densidad óptica espectrofotométrica (DO) a 511 nm y representando la curva de dilución estándar para extrapolar la concentración de nanopartículas de oro y los datos estándar proporcionados por los proveedores.

Eficacia *in vivo* de AS1411-GNP

[0049] Se adquirieron ratones BALB/c nu/nu hembra (Harlan Laboratories Inc, CA, EE.UU.) y se dispusieron en las instalaciones de cuidado de los animales de la Universidad de Louisville en condiciones libres de patógenos. Después de una semana de aclimatación, los ratones se inyectaron subcutáneamente en cada flanco con 5x10⁶ células MDA-MB-231 en PBS. Cuando los tumores eran palpables (6 días), los ratones se asignaron al azar en cinco grupos de cinco ratones en cada grupo tal como se muestra en la Tabla 3. Los ratones a continuación recibieron diariamente una inyección intraperitoneal (i.p.) durante 12 días. Se midieron el volumen y el peso del tumor con calibradores de pie de rey digitales (Fisher Scientific) dos veces a la semana y se calculó el volumen del tumor utilizando la fórmula $\frac{1}{2} (\text{altura}^2 \times \text{anchura})$ [17, 18]. El análisis estadístico se realizó utilizando Sigma Stat 10 para determinar la significación estadística mediante la prueba *t* de *student* estándar. El tratamiento con AS1411 (1 mg/kg de aptámero) redujo el crecimiento del tumor al 75% de los tumores tratados con vehículo ($p < 0,005$) y GNP-AS1411 (equivalente a 1 mg/kg de aptámero) redujo el crecimiento a 94% de los tumores de control ($p < 0,005$), mientras que las GNP y GNP-CRO (aptámeros de control) sólo tuvieron un efecto moderado sobre el crecimiento del tumor (Figura 1A). No hubo cambios significativos en el peso corporal de los ratones en ningún grupo (Figura 1B).

Tabla 3: Grupos de tratamiento

Grupo	Número	Dosis*
Sólo vehículo	5	0
AS1411	5	1 mg/kg
GNP	5	200 pg/kg
GNP-CRO	5	1 mg/kg
GNP-AS1411	5	1 mg/kg
*concentración de aptámero equivalente		

[0050] GNP indica el grupo tratado con 200 picogramos/kg de nanopartículas de oro no conjugadas (GNP); CRO-GNP indica el grupo tratado con 10 mg/kg de GNP conjugadas a oligonucleótido de control, basado en la cantidad de oligonucleótido solo; AS1411 indica el grupo tratado con 10 mg/kg de AS1411 (GRO26B; nucleótido no conjugado que tiene la SEQ ID NO 10.); AS1411-GNP indica el grupo tratado con 1 mg/kg de GNP conjugadas a AS1411, basado en la cantidad de oligonucleótido solo; y no tratados indica el grupo que no fue tratado. Los valores en la esquina inferior izquierda son los valores p relativos determinados usando la prueba T; los valores por debajo de 0,05 indican una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. El único valor de p superior a 0,05, GNP frente a AS1411, indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos (probablemente debido a los tamaños de muestra pequeños utilizados en este estudio).

[0051] Las figuras 2A y 2B son imágenes de dos ratones de xenoinjerto MDA231 (ratones desnudos inyectados con células de cáncer MDA231), 2 horas (A) y 6 horas (B) después de inyección retro-orbital con AS1411 conjugado con un fluoróforo (colorante de cianina Cy5) y nanopartículas de oro (AS1411-Cy5-GNP), o con un oligonucleótido de control conjugado con fluoróforo (colorante de cianina Cy5) y nanopartículas de oro (CRO-Cy5-GNP). Las imágenes fueron adquiridas mediante PHOTON IMAGER® a 680 nm. Las imágenes muestran que los tumores se acumulan AS1411-Cy5-GNP, mientras CRO-Cy5-GNP no se acumula.

Efectos antiproliferativos selectivos de tumor de AS1411-GNP sobre las células

[0052] Las figuras 3A-D muestran el efecto de proliferación celular de diferentes concentraciones de una de las composiciones indicadas, o sin tratamiento (NT), usando un ensayo de MTT. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1000 células/pocillo, y se trataron durante 5 días. GNP indica el grupo tratado con nanopartículas de oro no conjugadas; GNP-CR indica el grupo tratado con GNP conjugadas a oligonucleótido de control; AS1411 indica el grupo tratado con AS1411; GNP-AS indica el grupo tratado con GNP conjugadas a AS1411. La Figura 3A muestra el resultado del tratamiento de las células MDA231 (línea celular de cáncer de mama negativa de estrógenos), la Figura 3B muestra el resultado del tratamiento de las células MCF7 (línea celular de cáncer de mama dependiente de estrógeno), la Figura 3C muestra el resultado del tratamiento de células MCF10A (línea celular epitelial humana) y la Figura 3D muestra el resultado del tratamiento de células HS27 (línea celular de fibroblastos humanos).

[0053] Las figuras 4A-D son micrografías ópticas de las células MCF7 tratadas por tinción de mejora de plata para nanopartículas de oro, que ilustran la acumulación comparativa de nanopartículas de oro después de la administración de la composición indicada, o sin la administración. Tal como se muestra, no se produce acumulación significativa después de la administración de nanopartículas de oro no conjugadas (Figura 4B), y sólo se produce una ligera acumulación después de la administración de partículas de oro conjugadas a oligonucleótido de control (Figura 4C). La administración de las nanopartículas de oro conjugadas a AS1411, sin embargo, da lugar a la acumulación significativa de nanopartículas de oro, tal como se indica por las flechas (Figura 4D). También se muestran las células no tratadas (Figura 4A).

[0054] Las AS1411-GNP se sintetizaron para el tratamiento de cáncer y para la obtención de imágenes del cáncer. Los estudios para evaluar la actividad anticancerígena de AS1411 unido a nanopartículas de oro de 5 nm indicaron que los conjugados presentaban efectos antiproliferativos ampliamente mejorados sobre las células de cáncer de mama en comparación con AS1411 solo. El examen microscópico reveló un aumento de la captación en las células de cáncer de mama para GNP-AS1411 en comparación con GNP solas o GNP conjugadas con un oligonucleótido de control. La Figura 5 son micrografías electrónicas de células MDA231 después de la administración de la composición indicada. Tal como se muestra, no se produce ningún efecto significativo después de la administración de un oligonucleótido de control o partículas de oro conjugadas a oligonucleótido de control. Las etapas iniciales de apoptosis son evidentes después de la administración de AS1411. La administración de las nanopartículas de oro conjugadas a AS1411, sin embargo, da lugar a la formación de vacuolas y lo que parecen ser cuerpos apoptóticos, lo que indica que las células están muriendo en un proceso de tipo apoptosis.

[0055] La administración de GNP-AS1411 indujo la vacuolización de células de cáncer de mama y la muerte, similar a lo observado a concentraciones más altas de AS1411. Las GI50 para AS1411 conjugado a GNP contra las células de cáncer de mama estaban en el intervalo de 50 - 250 nM, en comparación con el intervalo de 1 - 10 uM para AS1411 no conjugado (concentración de aptámero equivalente). Los estudios preliminares indicaron que estos AS1411-GNP presentaban una captación selectiva en el tejido tumoral después de la administración sistémica en ratones. Por otra parte, AS1411-GNP retuvieron la selectividad del cáncer de AS1411 y no tuvieron efecto sobre las células no malignas.

[0056] Las figuras 6A-D son imágenes de microscopio confocal de células MCF7 después de la administración de la composición indicada; diferente sombreado indica las membranas celulares y nanopartículas de oro. Tal como se muestra, no se produce efecto significativo después de la administración de un oligonucleótido de control (Figura 6A) o partículas de oro conjugadas a oligonucleótido de control (Figura 6C). Las etapas iniciales de la apoptosis son evidentes después de la administración de AS1411 (Figura 6B). La administración de las nanopartículas de oro conjugadas a AS1411, sin embargo, muestran una ampliación drástica de las células (Figura 6D).

[0057] La Figura 7 son imágenes de microscopía fluorescente de células MCF7 después de 5 días de la administración de la composición indicada; diferente sombreado indica las membranas celulares y nanopartículas de oro. Tal como se muestra, no se produce efecto significativo después de la administración de un oligonucleótido de control, GNP no conjugadas o partículas de oro conjugadas a oligonucleótido de control. Las etapas iniciales de la apoptosis son evidentes después de la administración de AS1411-Cy5. La administración de AS1411-Cy5 conjugado a nanopartículas de oro, sin embargo, muestra una ampliación drástica de las células y la acumulación de GNP. También se muestran las células no tratadas.

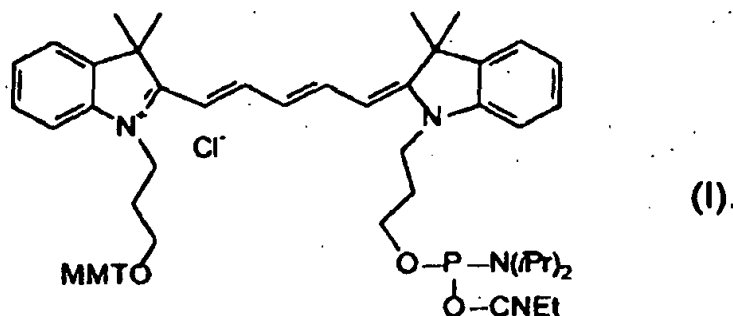
[0058] La Figura 8 son imágenes de microscopía fluorescente de células MDA231 después de 5 días de la administración de la composición indicada; diferente sombreado indica las membranas celulares y nanopartículas de oro. Tal como se muestra, no se produce un efecto significativo después de la administración de un oligonucleótido de control, GNP no conjugadas o partículas de oro conjugadas a oligonucleótido de control. Las etapas iniciales de la apoptosis son evidentes después de la administración de AS1411-Cy5. La administración de AS1411-Cy5 conjugado a nanopartículas de oro, sin embargo, muestra una ampliación drástica de las células y la acumulación de GNP. También se muestran las células no tratadas.

Comparación de diferentes vías de inyección para la administración de AS1411-GNP en el tejido diana

[0059] Se ensayaron tres rutas diferentes de inyección para la administración de GNP-AS1411 a tejido diana: inyección intraperitoneal, intravenosa, a través de la vena de cola, retro-orbital. En base a estudios piloto, se determinó que para inyecciones a largo plazo y repetidas (tal como en la dosificación terapéutica), se prefirió la inyección intraperitoneal por su comodidad y porque la biodistribución más lenta (en comparación con intravenosa o retro-orbital) no era una preocupación. Para la obtención de imágenes, se utilizaron inyecciones en la vena de cola o retro-orbital porque liberaban el fármaco directamente en la sangre, lo que resulta en una distribución sistémica más rápida y evita la señal residual en el peritoneo que se observó cuando se administraba a través de la vía intraperitoneal. Los estudios piloto *in vivo* en ratones con xenoinjertos de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 han demostrado que la administración intravenosa de AS1411-GNP a 1 mg/kg/día durante 14 días podría inhibir casi por completo el crecimiento del tumor. Estas actividades inhibitorias del crecimiento del tumor estaban relacionadas con aptámero porque las GNP conjugadas a ADN de control tenían poca o ninguna actividad, en términos de internalización en las células de cáncer de mama, la absorción en los xenoinjertos, y los efectos inhibidores sobre las células de cáncer de mama que crecen en cultivo o *in vivo*.

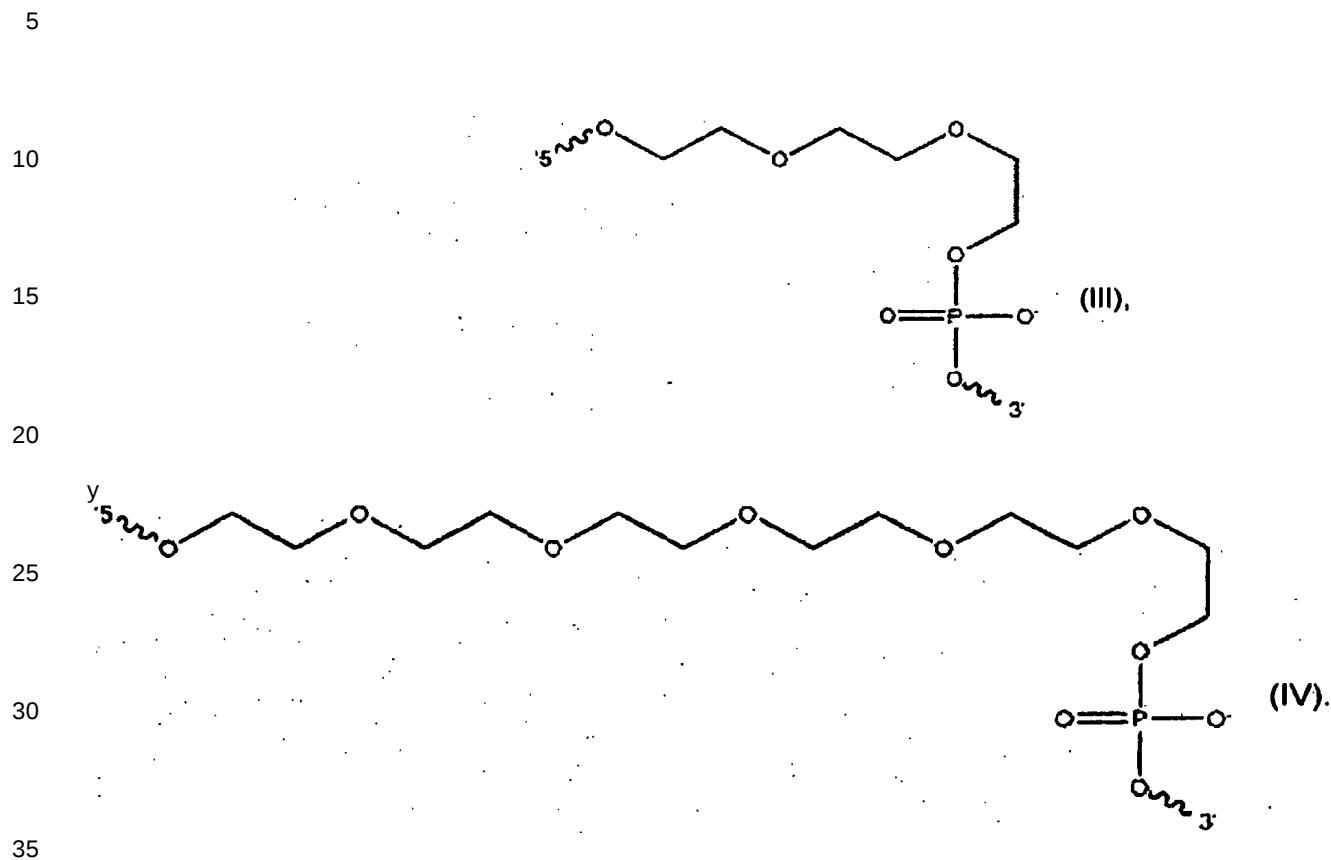
Efecto del tamaño de las GNP y la longitud de los enlazadores sobre la proliferación celular

[0060] Las síntesis y análisis de las GNP y enlazadores se realizaron de la siguiente manera: se adquirieron nanopartículas de oro esféricas coloidales de diferentes tamaños (5, 10, 15 nm) de Ted Pella Inc. (Redding, CA) y Nanopartz (Loveland, CO). Los análisis de tamaño de estas nanopartículas de oro se confirmaron utilizando PARTICLES SIZE ANALYZER 90 PLUS (Brookhaven Instrument), y los tamaños de las nanopartículas de oro se encontraban dentro de los intervalos descritos por los fabricantes. Los oligonucleótidos unidos a fluoróforo (Cy5) (AS1411 y CRO), con o sin espaciadores de carbono y grupos tiol, se adquirieron de Integrated DNA Technologies (San Diego, CA). Cy5 o cianina-5 fosforamidita (cloruro de 1-[3-(4-monometoxitritiloxi)propil]-1'-[3-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)fosforamiditil]propil]-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina) tiene la estructura mostrada en la Fórmula I:



[0061] Los enlazadores, C3-tiol (1-O-dimetoxitritil-propil-disulfuro, 1'-succinil-icaa), MC6-D/iSP-9 (glicol 9-O-dimetoxitritil-trietilenglicol, 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]), y MC6-D/iSP-18 (18-O-dimetoxitritilhexaetilenglicol, 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilo)]), tienen las estructuras mostradas en las fórmulas II, III y IV, respectivamente:





La figura 9A es una representación con dibujos de los diversos agentes ensayados. La figura 9B es una ilustración de la reacción para formar conjugados y para separar las partes de los conjugados. Se realizó un ensayo de proliferación/citotoxicidad celular (MTT) mediante el tratamiento de células MDA-231 con diferentes tamaños de nanopartículas de oro (5, 10, 15nm) y tres enlazadores de diferentes longitudes (C3-tiol, MC6-D/iSP-9, y MC6-D/iSP-18) durante 72 horas a concentraciones equivalentes a 200 nM de oligonucleótido. El tamaño y composición óptimos para partículas de GNP-AS1411 se determinó en términos de su actividad antiproliferativa contra células de cáncer de mama. Los efectos más profundos en la proliferación de las células tuvieron lugar usando GNP-AS1411 de diámetro promedio de 5 nm con enlazador C3 tiol (inhibición 64%), seguido de 10 nm con enlazador C3 tiol (inhibición 50%) (Figura 10 y la tabla 4).

Tabla 4: Porcentaje del crecimiento celular después del tratamiento con GNP-AS1411, con diferentes tamaños de GNP y diferentes longitudes de enlazadores durante 72 horas.

Tamaño de GNP	No tratado (control)	Sólo GNP	C3-tiol	MC6-D/iSP-9	MC6-D/iSP-18
5 nm	100	92	36	61	78
10 nm	100	90	50	84	83
15 nm	100	93	74	68	65

Las nanopartículas de oro (5 nm) conjugadas a AS1411 (GNP-AS1411) causan apoptosis/necrosis tardía de células de cáncer de mama MDA-MB-231

[0062] El alcance y el mecanismo de la muerte celular inducida por GNP-AS1411 activo se investigó mediante citometría de flujo (Figuras 11A-G). El análisis de citometría de flujo de células MDA-MB-231 teñidas con FITC-anexina V y yoduro de propidio (PI) mostró que GNP-AS1411 podría inducir potencialmente y específicamente la muerte celular en células de cáncer de mama. Los ensayos de citometría de flujo se realizaron con el kit de detección de apoptosis FITC Annexin V (BD Bioscience) y el análisis de datos se realizó utilizando el software FLOW JO (ver. 7.6.5). Las células MDA-MB-231 (5x10⁴) se sembraron en un matraz T-25 en medio completo y se trataron como se indica. La tinción identificó las células que eran viables (negativo para PI y Anexina V), células apoptóticas tempranas (positivo para Anexina V, pero negativo para PI) y células apoptóticas o necróticas tardías (positivo tanto para PI como Anexina V). (A) En la muestra de control no tratado de MDA-MB-231, la mayoría de las células (83%)

eran viables. (B) En las células con AS1411 (10 μ M) durante 72 horas, hubo una disminución en la población viable y un aumento de la población apoptótica temprana (12%) y población apoptótica/necrótica tardía (14%). (C) Las células tratadas con oligonucleótidos de control CRO mostraron una población en su mayoría viable de células (90%), similar al control sin tratar. (D) Las células tratadas con nanopartículas de oro no conjugadas mostraron que la mayoría de las células eran viables (83%). (E) Las células MDA-MB-231 tratadas con GNP-AS1411 (200 nM de concentración de aptámero equivalente) presentaron un gran aumento de la población de células positivas para anexina V y/o PI, con la mayoría (71%) mostrando evidencia de apoptosis o necrosis tardías. (F) Las células tratadas con el control de GNP-CRO (200 nM concentración de aptámero equivalente) mostraron resultados comparables con los controles no tratados y tratados con GNP. El control positivo (G) fueron las células tratadas con camptotecina (6 μ g/ml durante 20 horas) para mostrar las células positivas a anexina V y PI, que es indicativo de apoptosis (21%) y células apoptóticas tardías (17%).

Biodistribución in vivo de AS1411-GNP conjugado con fluoróforo Cy5

[0063] El uso de estrategias de obtención de imágenes multimodales utilizando óptica y microCT era útil para la detección de tumores de cáncer de mama primarios o diseminados. En este experimento, se unió un fluoróforo Cy5 con el extremo 5' de AS1411 y se conjugó a GNP (para dar GNP-AS1411-Cy5), a fin de evaluar su utilidad como complejo, no sólo para la obtención de imágenes ópticas, sino también como agente de contraste para la tomografía computarizada (TC). Se sintetizó una construcción similar con CRO como control. Se administraron a ratones desnudos con xenoinjertos de cáncer de mama MDA-MB-231 en cada flanco una inyección única de fluoróforo-oligonucleótido-GNP. Las imágenes fueron adquiridas mediante IVIS Imaging System/MAESTRO Fluorescence Imaging y los datos preliminares mostraron que la concentración de GNP-AS1411-Cy5 (1 mg/kg) en el tumor es muchas veces más que usando AS1411-Cy5 sin GNP (10 mg/kg), o GNP-CRO-Cy5 (Figura 12). Se observó que todos los ratones mostraban señales intensas en sus extremidades (piernas y patas), y las colas; éstas eran artefactos de la orina y las heces de los ratones en la jaula en la que se encontraban (posiblemente debido a una sustancia fluorescente en la alimentación animal). El lavado de los ratones y su colocación en nuevas jaulas limpias antes de la obtención de imágenes pueden evitar este problema. El análisis de biodistribución confirmó también que, además del hígado, el riñón y el intestino, la mayoría de GNP-AS1411 se acumulaba en el tumor (Figura 13). Esta es una prueba de concepto de que la conjugación de AS1411 a nanopartículas de oro puede dirigirse específicamente a los tumores. Los ratones se trataron mediante inyección intraperitoneal con las sustancias indicadas y se obtuvieron imágenes de después de 96 h. Las imágenes mostraron una alta acumulación de GNP-AS1411-Cy5 (1 mg/kg de concentración de aptámero) en xenoinjerto de cáncer de mama, en comparación con AS1411 (10 mg/Kg) y el GNP-CRO solo.

REFERENCIAS

[0064]

- [1] Stedman, T.L. 2000. Stedman's medical dictionary. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia. XXXVI, [127], 2098.
- [2] Miller, D., P. Bates, y J. Trent. 2000. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides and method of using same to bind to nucleolin, publicación internacional N ° WO 00/61597.
- [3] Bates PJ, Miller D M, Trent J O, Xu X, "A new method for the diagnosis and prognosis of malignant diseases" solicitud internacional, publicación internacional N° WO 03/086174 A2 (23 Oct 2003).
- [4] Bates PJ, Miller D M, Trent JO, Xu X, "Method for the diagnosis and prognosis of malignant diseases", publicación de solicitud de patente de Estados Unidos, Publicación No. US 2005/0053607 A1 (10 Marzo 2005).
- [5] Derenzini M, Sirri V, Trere D, Ochs R L, "The Quantity of Nucleolar Proteins Nucleolin and Protein B23 is Related to Cell Doubling Time in Human Cancer Cells" Lab. Invest. 73:497-502 (1995).
- [6] Bates P J, Kahlon J B, Thomas S D, Trent J O, Miller D M, "Antiproliferative Activity of G-rich Oligonucleotides Correlates with Protein Binding" J. Biol. Chem. 274:26369-77 (1999).
- [7] Miller D M, Bates P J, Trent J O, Xu X, "Method for the Diagnosis and Prognosis of Malignant Diseases" publicación de solicitud de patente de Estados Unidos, Publicación No. US 2003/0194754 A1 (16 Octubre 2003).
- [8] Bandman O, Yue H, Corley N C, Shah P, "Human Nucleolin-like Protein" patente de Estados Unidos No. 5,932,475 (3 Agosto 1999).
- [9] Reyes-Reyes E M, Teng Y, Bates P J, "A New Paradigm for Aptamer Therapeutic AS1411 Action: Uptake by Macropinocytosis and, Its Stimulation by a Nucleolin-Deoendnet Mechanism" Cancer Res 70(21): 8617-29 (2010).
- [10] Huang Y, Shi H, Zhou H, Song X, Yuan S, Luo Y, "The Angiogenic Function of Nucleolin is Mediated by Vascular Endothelial Growth Factor and Nonmuscle Myosin" Blood 107(9): 3564-71 (2006).

[11] Jain, K.K., Advances in the field of nanooncology. BMC medicine, 2010. 8: pág 83.

[12] Portney, N.G. and M. Ozkan, Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. Analytical and bioanalytical chemistry, 2006. 384(3): pág. 620-30.

[13] Bates, P.J., E.W. Choi, and L.V. Nayak, G-rich oligonucleotides for cancer treatment Methods in molecular biology, 2009. 542: pág. 379-92.

[14] Bates, P.J., et al., Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. Experimental and molecular pathology, 2009. 86(3): pág. 151-64.

[15] Soundararajan, S., et al., The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells. Cancer research, 2008. 68(7): pág. 2358-65.

[16] Javier, D.J., et al., Aptamer-targeted gold nanoparticles as molecular-specific contrast agents for reflectance imaging. Bioconjugate chemistry, 2008. 19(6): pág. 1309-12.

[17] Euhus, D.M., et al., Tumor measurement in the nude mouse. Journal of surgical oncology, 1986. 31(4): pág. 229-34.

[18] Tomayko, M.M. and C.P. Reynolds, Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. Cancer chemotherapy and pharmacology, 1989. 24(3): pág. 148-54.

[19] Girvan, A.C., et al., AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin. Molecular cancer therapeutics, 2006. 5(7): pág. 1790-9.

[20] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods, 1983. 65(1-2): pág. 55-63.

[21] Vermes, I., et al., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled-Annexin V. Journal of immunological methods, 1995. 184(1): pág. 39-51.

[22] Sprague, J.E., et al., Noninvasive imaging of osteoclasts in parathyroid hormone-induced osteolysis using a 64Cu-labeled RGD peptide. Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine, 2007. 48(2): p. 311-8.

[23] Morgan D. M., Methods Mol. Biol. 1998. 79:179-183.

[24] Zhang, Y. et al., A surface-charge study on cellular-uptake behavior of F3-peptide-conjugated iron oxide nanoparticles. Small, 2009 5(17): p.1990-6.

[25] Orringer, D.A., et al. In vitro characterization of a targeted, dye-loaded nanodevice for intraoperative tumor delineation. Neurosurgery, 2009 64(5): pág. 965-72.

Realizaciones adicionales de la invención

[0065]

1. Una composición, que comprende un agente antinucleolina conjugado con nanopartículas, en la que las nanopartículas son no magnéticas, no son de óxido de hierro y no son de poliacrilamida.

2. La composición de la realización 1, en la que las nanopartículas comprenden al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en metales, elementos y óxidos.

3. La composición de la realización 1, en la que las nanopartículas comprenden oro.

4. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende un oligonucleótido antinucleolina.

5. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende un anticuerpo.

6. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende una proteína de direccionamiento de nucleolina.

7. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende un GRO.
- 5 8. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-7; 9-16; 19-30 y 31.
9. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende además un colorante de cianina.
- 10 10. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de 1 a 50 nm.
11. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de 1 a 20 nm.
- 15 12. La composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que las nanopartículas comprenden al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en oro, platino, iridio y paladio.
13. Una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, que comprende la composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 14. Una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, que comprende una composición, que comprende un agente antinucleolina conjugado a nanopartículas, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 15. La composición farmacéutica de la realización 14, en la que las nanopartículas comprenden al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en metales, elementos y óxidos.
- 30 16. La composición farmacéutica de la realización 14, en la que las nanopartículas comprenden oro.
17. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende un oligonucleótido antinucleolina.
- 35 18. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende un anticuerpo.
19. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende una proteína de reconocimiento de nucleolina.
- 40 20. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende un GRO.
21. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-7; 9-16; 19-30 y 31.
- 45 22. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el agente antinucleolina comprende AS1411.
- 50 23. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende además un colorante de cianina.
24. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de 1 a 50 nm.
- 55 25. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de 1 a 20 nm.
26. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que las nanopartículas comprenden al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en oro, platino, iridio y paladio.
- 60 27. Un procedimiento de tratamiento de cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, a un paciente en necesidad de la misma.
- 65 28. El procedimiento de tratamiento de cáncer de la realización 27, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, linfoma, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, leucemia, cáncer de mama, cáncer de

próstata, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y de hepatoma.

29. El procedimiento de tratamiento de cáncer de cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer de pulmón.

30. El procedimiento de tratamiento de cáncer de cualquiera de las realizaciones anteriores, que además comprende administrar un segundo tratamiento de cáncer seleccionado del grupo que consiste en vinorelbina, mitomicina, camptotecina, ciclofosfamida, metotrexato, citrato de tamoxifeno, 5-fluorouracilo, irinotecan, doxorubicina, flutamida, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, mesilato de imatinib, antraciclina, letrozol, trióxido de arsénico, anastrozol, pamoato de triptorelina, ozogamicina, clorhidrato de irinotecan, BCG vivo, implante de acetato de leuprolide (Viadur), bexaroteno, exemestano, clorhidrato de topotecan, gemcitabina HCl, clorhidrato de daunorubicina, gemcitabina HCl, citrato de toremifeno (Fareston), carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y cualquier otro fármaco oncológico que contiene platino, trastuzumab, lapatinib, gefitinb, cetuximab, panitumumab, temsirolimus, everolimus, vandetanib, vemurafenib, crizotinib, vorinostat, bevacizumab, terapia de radiación, hipertermia, terapia génica y terapia fotodinámica.

31. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, linfoma, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cuello uterino y de hepatoma.

32. Uso de la composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

33. El uso de la composición farmacéutica de la realización 45, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, linfoma, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y de hepatoma.

34. Un agente para la formación de imágenes, que comprende la composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que las nanopartículas son no magnéticas, no son de óxido de hierro y no son de poliacrilamida.

35. Un procedimiento de obtención de imágenes del cáncer *in vivo*, que comprende: administrar el agente de formación de imágenes de cualquiera de las realizaciones anteriores, a un sujeto y formar una imagen del agente de formación de imágenes presente en el sujeto.

36. Un agente de formación de imágenes para obtener imágenes de cáncer *in vivo*, que comprende la composición para tratar el cáncer de cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende además un colorante de cianina, en el que las nanopartículas son no magnéticas, no son de óxido de hierro y no son de poliacrilamida.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 [0066]

<110> BATES, PAULA J. MALIK, MOHAMMAD TARIQ KANG, KYUNG A.
 <120> NANOPARTÍCULAS CONJUGADAS A UN AGENTE ANTINUCLEOLINA
 <130> LOU01-026-DIV-EP
 <140> 61/492.683
 <141> 2011-06 -02
 <160> 42
 <170> PatentIn Ver. 3.2
 <210> 1
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 1
 tttggtggtg gttggtgtgg tgggtgtgg 29
 <210> 2
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 2
 tttggtggtg gtggttttgg tgggtggtg 29
 <210> 3
 5 <211> 29
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 10 <400> 3
 tttggtggtg gtggtggtgg tgggtggtg 29
 <210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 < 400> 4
 tttggtggtg gtggtttggg tgggtggtg 29
 20 <210> 5
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 5
 tgggtggtggt ggt 13
 <210> 6
 < 211> 14
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 6
 35 ggtggttgtg gtgg 14
 <210> 7
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 7
 gttgtttggg gtggt 15
 <210> 8
 45 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 50 <400> 8
 ttgggggggg tgggt 15
 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 55 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 9
 ggttggggtg ggtggggtg gtggg 25
 60 <210 > 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 10

ggtggtggtg gttgtggtgg tgggtg 26
 <210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 11
 gtggttggg ttggtggtg tgggtg 28
 10 <210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 12
 ttggtggtg gtggtggtg ggtggtg 28
 <210> 13
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 13
 25 ggtggtggtg gttgtggtgg tgggtggtt 29
 <210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 14
 ggtggtggtg gtggttggg tgggtggtg gg 32
 <210> 15
 35 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 40 <400> 15
 ttggtggtg gtggttggg tgggtggtg tt 32
 <210> 16
 <211> 56
 <212> ADN
 45 <213> artificial secuencia
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 16
 ggtggtggtg gttgtggtg tgggtggtg ggtggtggtg gttgtggtg tgggtg 56
 50 <210> 17
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 17
 tcgagaaaaa ctctctctc ctctctctc ctcca 35
 <210> 18
 <211> 29
 60 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 18
 65 ttctctctc ctctctctc tcctctcc 29
 <210> 19

<211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 19
 ttaggggttag ggtaggggt AGGG 24
 <210> 20
 <211> 11
 10 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 20
 15 ggtggtggtg g 11
 <210> 21
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 21
 ggtgtgtgtg gtgg 14
 <210> 22
 25 <211> 15
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 30 <400> 22
 ggtgtgtgtg gttgg 15
 <210> 23
 <211> 10
 <212> ADN
 35 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 23
 gggtttggg 10
 40 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 24
 ggttttggt ttggtttgg 20
 <210> 25
 <211> 15
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 25
 55 ggtggtgtg gttgg 15
 <210> 26
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 26
 ggggtttgg gg 12
 <210> 27
 65 <211> 10
 <212> ADN

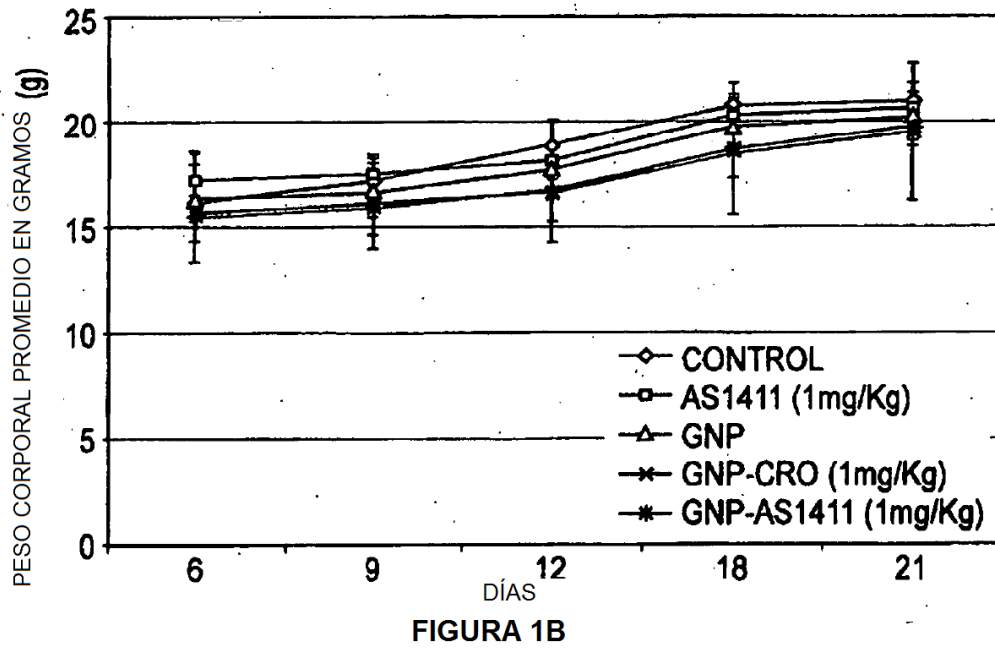
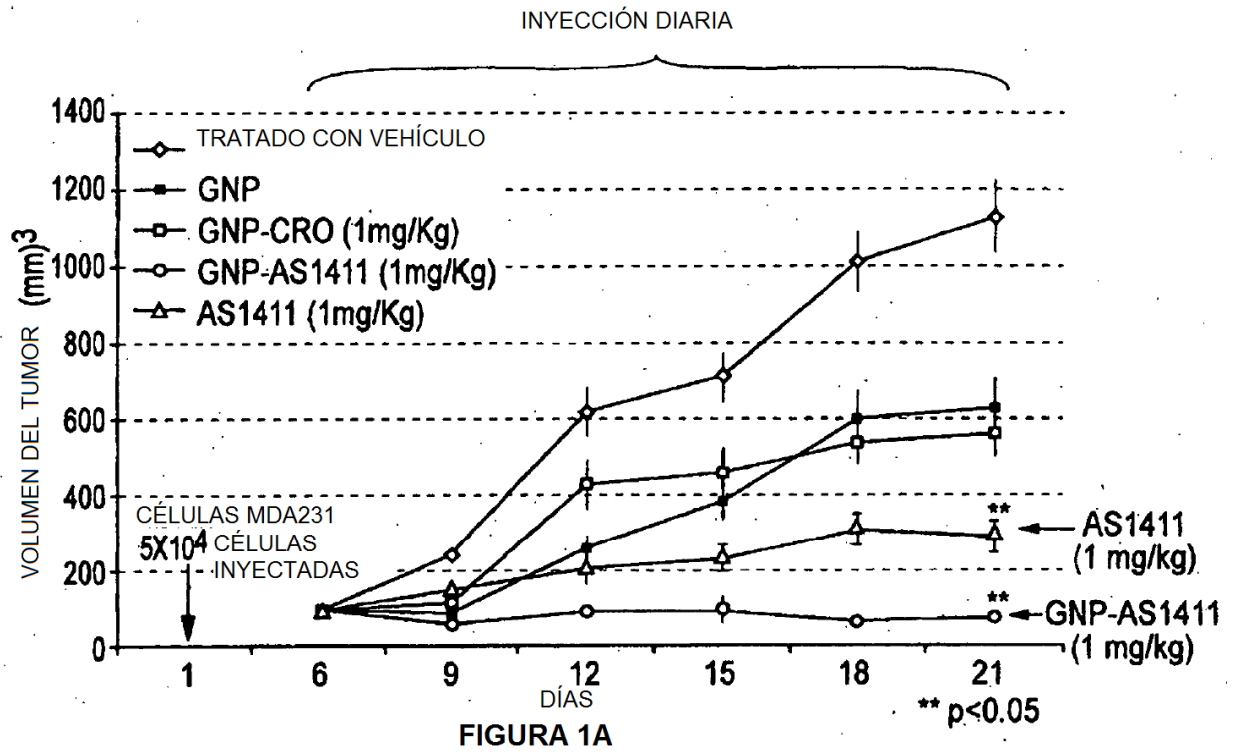
<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 27
 5 ggggttttggg 10
 <210> 28
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 28
 ggggttttgg ggttttgggg ttttgggg 28
 <210> 29
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 20 <400> 29
 ttgggggttg ggttggggtt gggg 24
 <210> 30
 <211> 16
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de artificial secuencia: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 30
 ggggtgggttg gtgggt 16
 30 <210> 31
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 31
 ggttttgggt ttttgg ttggttttgg 26
 <210> 32
 <211> 29
 40 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 32
 45 tttctctctc ctctctctcc tctctctcc 29
 <210> 33
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 33
 cctctctctc cttctctctc tctctcc 26
 <210> 34
 55 <211> 6
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 60 <400> 34
 tgggggt 6
 <210> 35
 <211> 7
 <212> ADN
 65 <213> secuencia artificial
 <220>

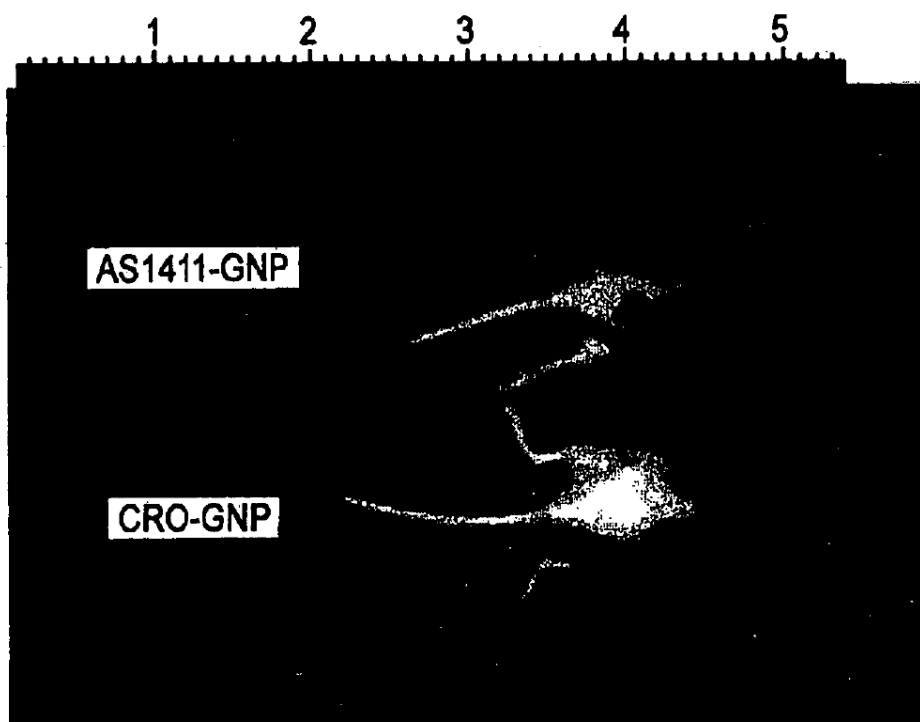
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 35
 gcatgct 7
 <210> 36
 5 <211> 11
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 10 <400> 36
 gcggttgcg g 11
 <210> 37
 <211> 4
 < 212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 37
 Tagg 4
 20 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223 > Descripción de la secuencia artificial: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 38
 ggggttgagg tgggggttg ggg 23
 <210> 39
 <211> 35
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> BASE MODIFICADA
 <222> 1
 35 <223> n = t modificada con modificador 5' tiol C6 S-S (5TioMC6-D)
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del polinucleótido sintético
 <400> 39
 nttttggtg gtggtggtg tgggtggtg ggttt 35
 40 <210> 40
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <221> BASE MODIFICADA
 <222> 1
 <223> n = t modificada con modificador 5' tiol C6 S-S (5TioMC6-D)
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia del polinucleótido sintético
 50 <400> 40
 nttttcctc tctctcctc tctctcctc CCTTT 35
 <210> 41
 <211> 35
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> BASE MODIFICADA
 <222> 1
 <223> n = t modificada con modificador 5' tiol C6 S-S (5TioMC6-D)
 60 <220>
 <221> BASE MODIFICADA
 <222> 35
 <223> n = t modificada con Cy5Sp
 <220>
 65 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del polinucleótido sintético
 <400> 41

ntttttggtg gtggtggttg tgggtggtgt ggtn 35
 <210> 42
 <211> 35
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> BASE MODIFICADA
 <222 > 1
 <223> n = t modificada con modificador 5' tiol C6 S-S (5TioMC6-D)
 10 <220>
 <221> BASE MODIFICADA
 <222> 35
 <223> n = t modificada con Cy5Sp
 <220>
 15 <223> Descripción de la artificial secuencia: secuencia de polinucleótido sintético
 <400> 42
 ntttttcttc ctctctcttc tctctctct ccttn 35

REIVINDICACIONES

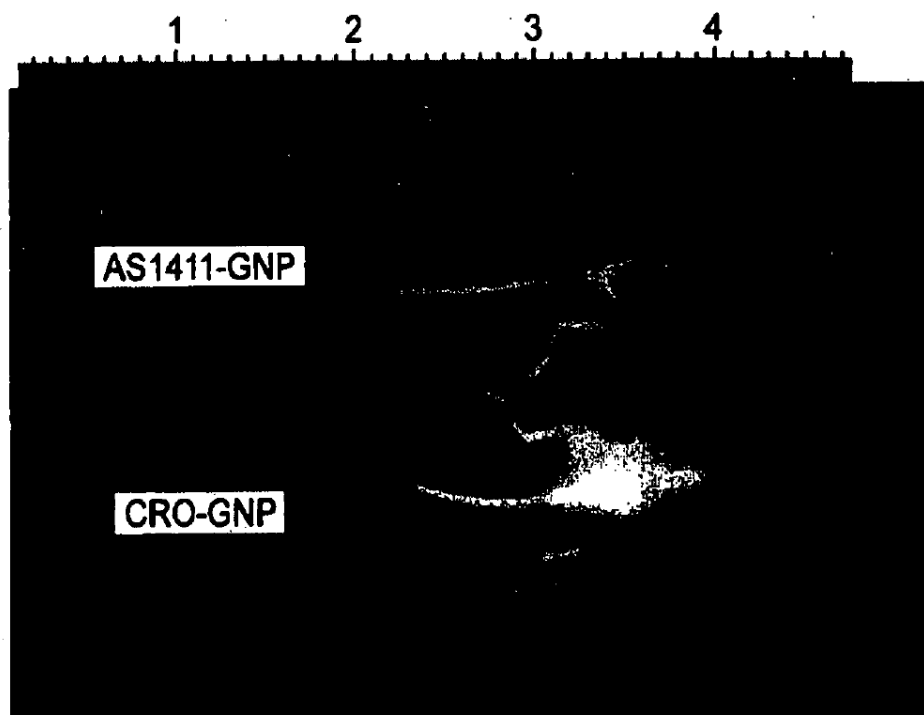
1. Composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento del cáncer, que comprende:
un agente antinucleolina conjugado a nanopartículas y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que:
5 las nanopartículas comprenden oro;
el agente antinucleolina comprende la SEQ ID NO: 10 (AS1411); y el cáncer se selecciona del grupo que consiste en
melanoma, linfoma, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer
de colon, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de
endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cuello uterino y de hepatoma.
10
2. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 1, que comprende además un colorante de
cianina.
3. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que las
15 nanopartículas tienen un diámetro promedio de 1 a 50 nm.
4. Composición farmacéutica para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las
nanopartículas tienen un diámetro promedio de 1 a 20 nm.
- 20 5. Composición farmacéutica para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el cáncer se
selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer de pulmón.
6. Composición farmacéutica para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que se
administra un segundo tratamiento contra el cáncer seleccionado del grupo que consiste en vinorelbina, mitomicina,
25 camptotecina, ciclofosfamida, metotrexato, citrato de tamoxifeno, 5-fluorouracilo, irinotecan, doxorubicina, flutamida,
paclitaxel, docetaxel, vinblastina, mesilato de imatinib, antraciclina, letrozol, trióxido de arsénico, anastrozol, pamoato
de triptorelina, ozogamicina, clorhidrato de irinotecan, BCG vivo, implante de acetato de leuprolide (Viadur),
bexaroteno, exemestano, clorhidrato de topotecan, gemcitabina HCl, clorhidrato de daunorubicina, citrato de
toremifeno (Fareston), carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y cualquier otro fármaco oncológico que contiene platino,
30 trastuzumab, lapatinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab, temsirolimus, everolimus, vandetanib, vemurafenib,
crizotinib, vorinostat, bevacizumab, terapia de radiación, hipertermia, terapia génica y terapia fotodinámica.





2 HORAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN

FIGURA 2A



6 HORAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN

FIGURA 2B

ENSAYO MTT MDA231

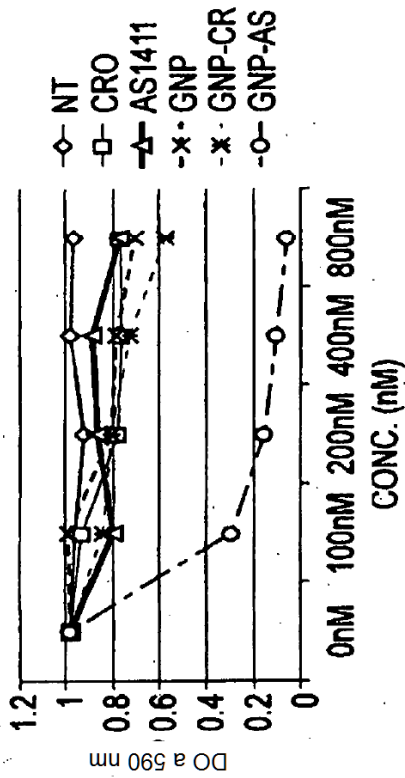


FIGURA 3A

ENSAYO MTT MCF7

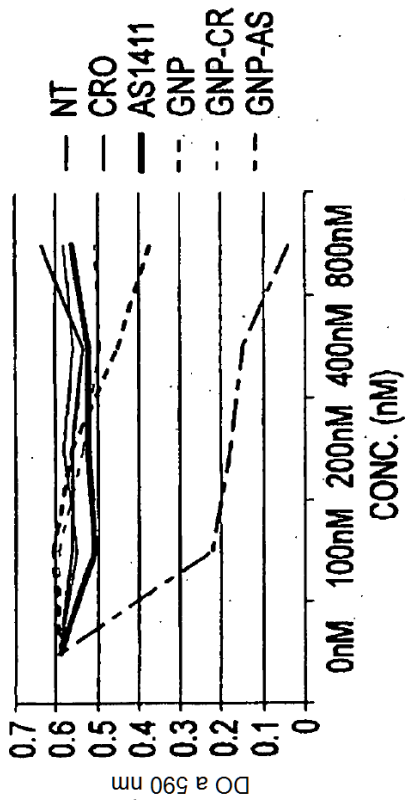


FIGURA 3B

ENSAYO MTT MCF10A

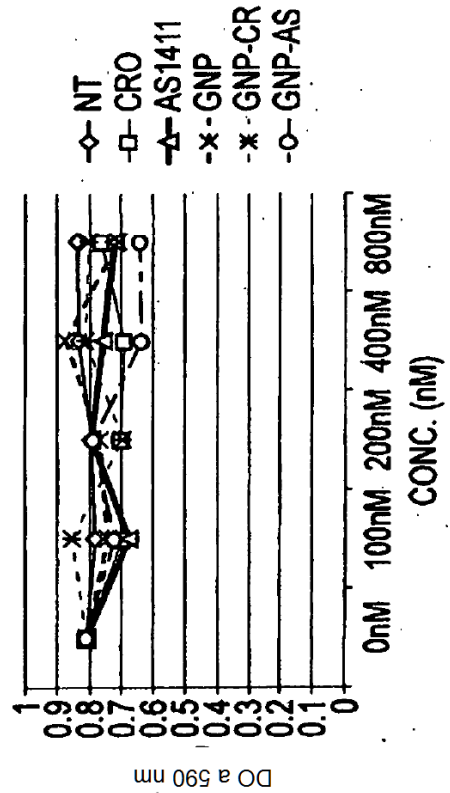


FIGURA 3C

ENSAYO MTT HS27

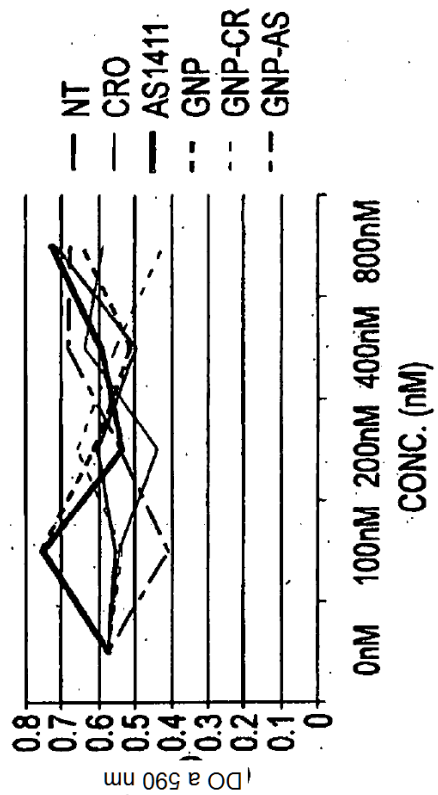
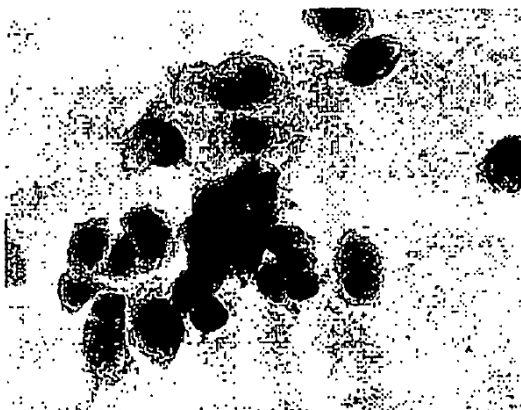


FIGURA 3D



NO TRATADO

FIGURA 4A



NANOPARTÍCULAS DE ORO

FIGURA 4B



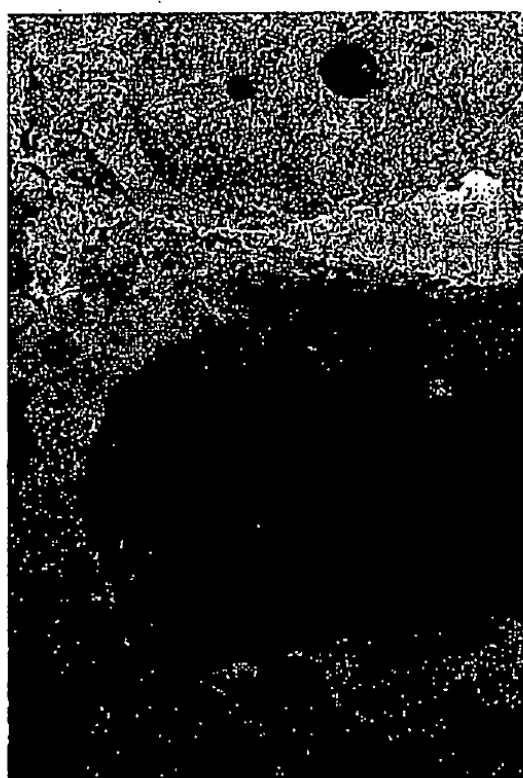
GNP-CRO (200nM)

FIGURA 4C



GNP-AS1411 (200nM)

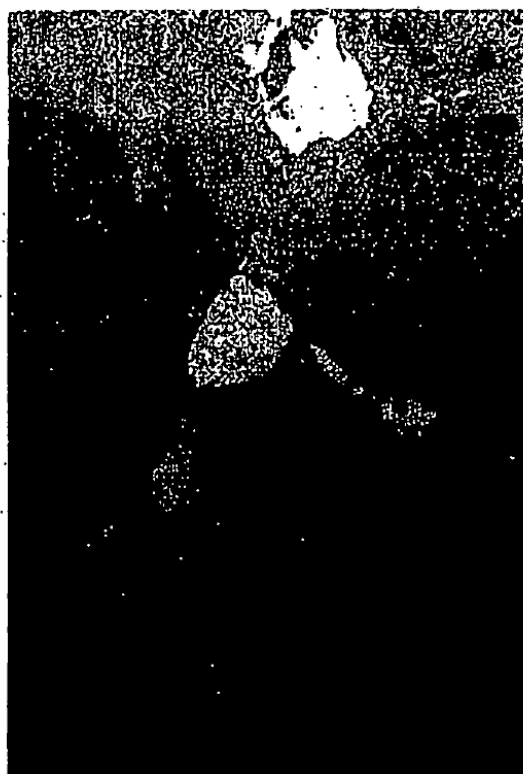
FIGURA 4D



GNP-CRO (200nM)



GNP-AS1411 (200uM)

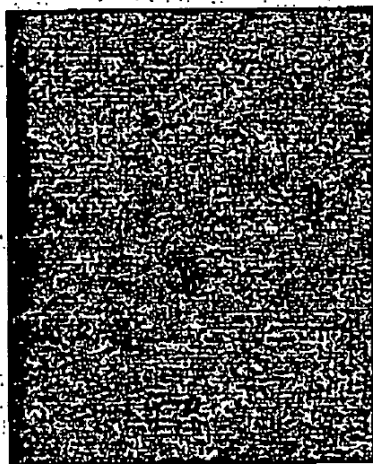


CRO (10uM)

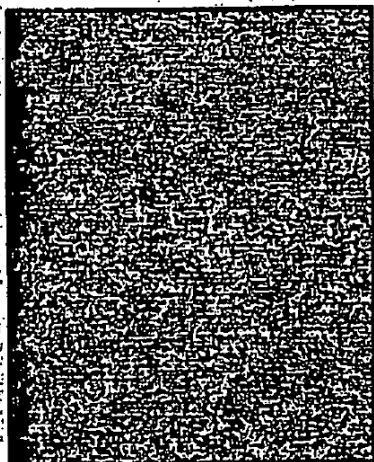


AS1411 (10uM)

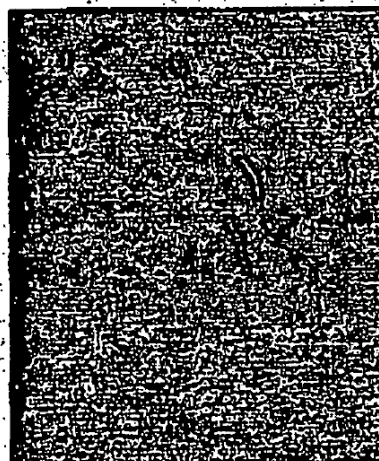
FIGURA 5



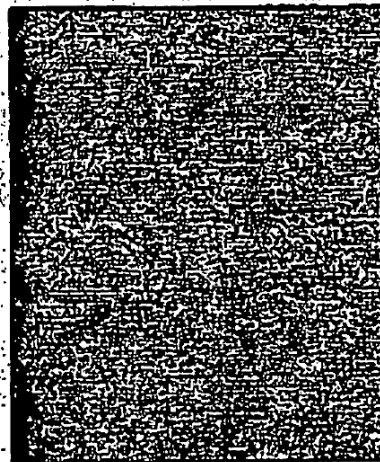
CRO-Cy5 (10uM)
FIGURA 6A



AS1411-Cy5 (10uM)
FIGURA 6B



GNP-Cy5-CRO (200nM)
FIGURA 6C



GNP-Cy5-AS1411 (200nM)
FIGURA 6D

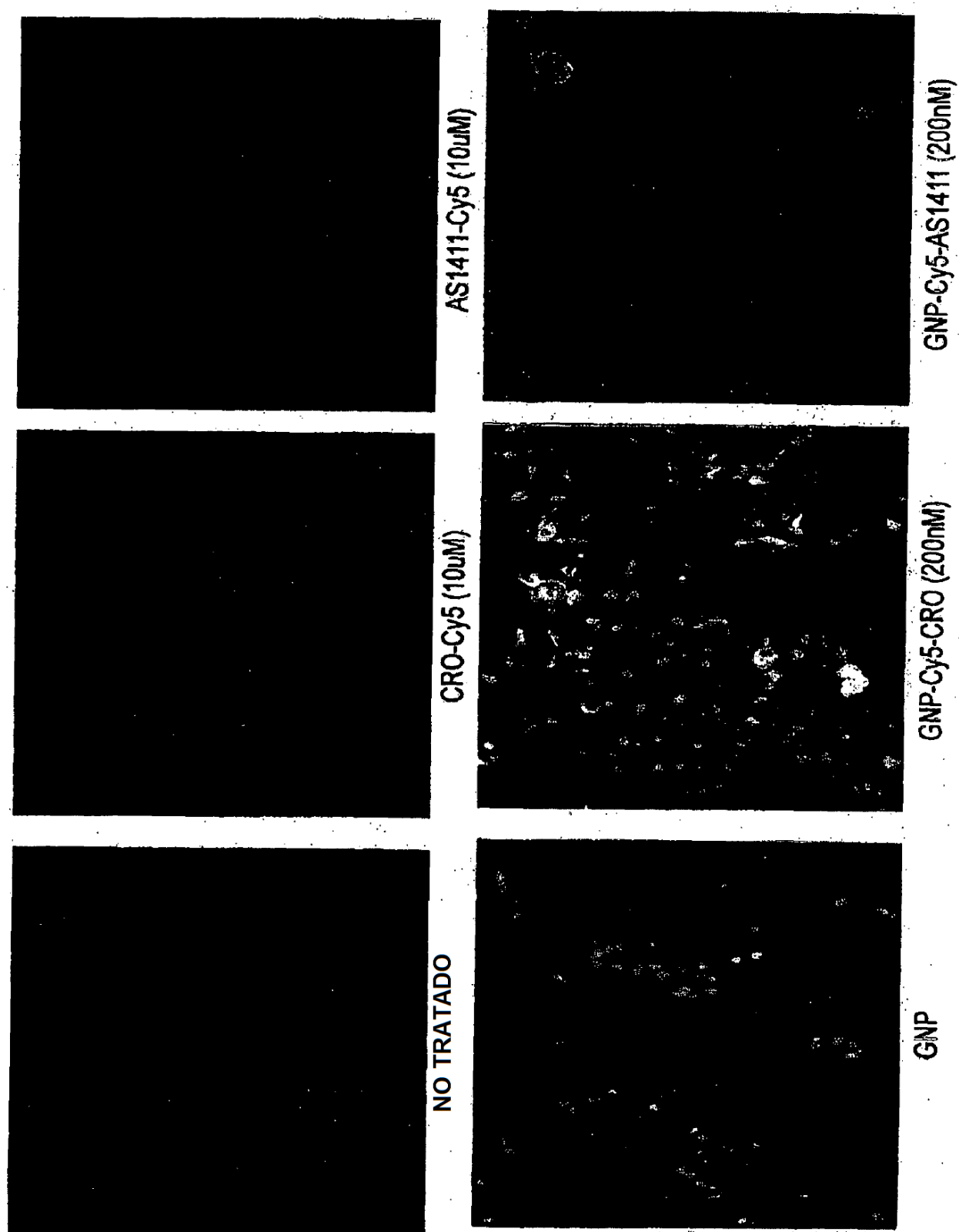


FIGURA 7

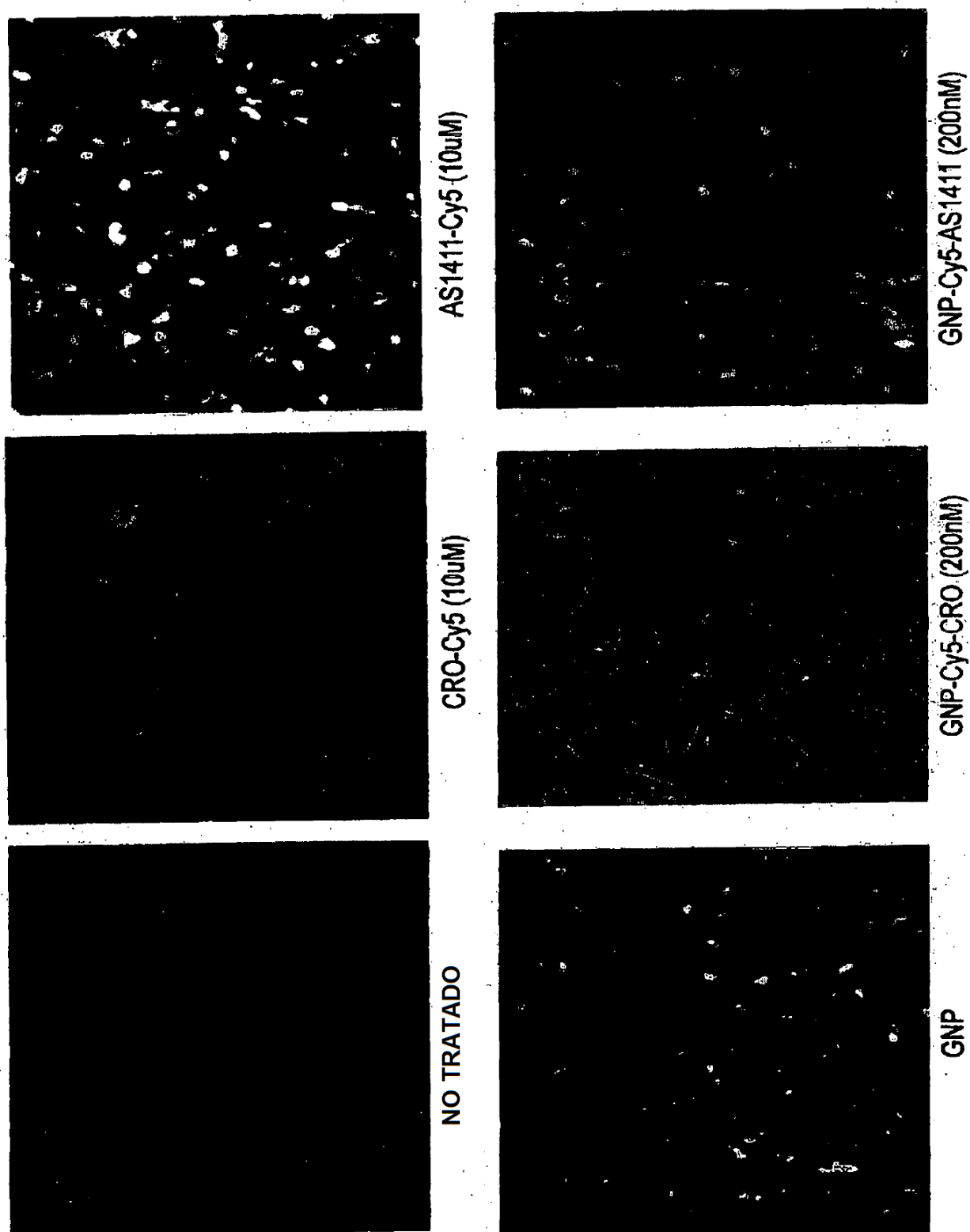


FIGURA 8

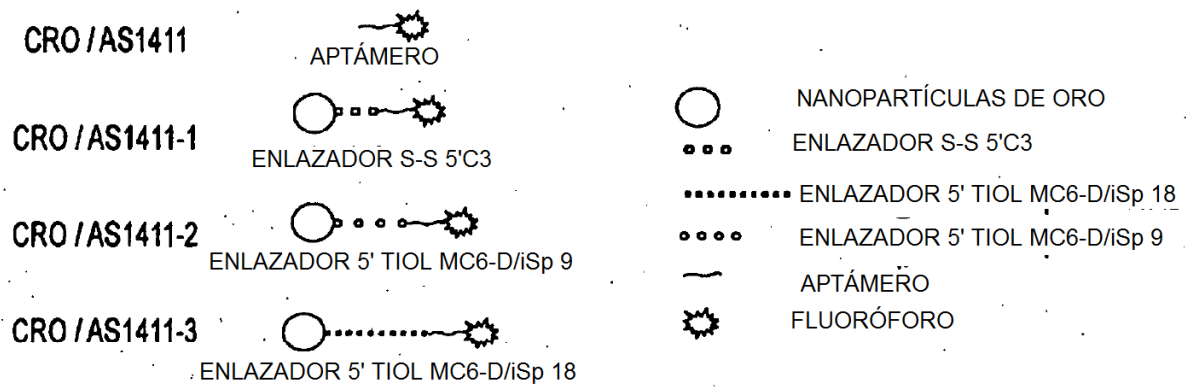


FIGURA 9A

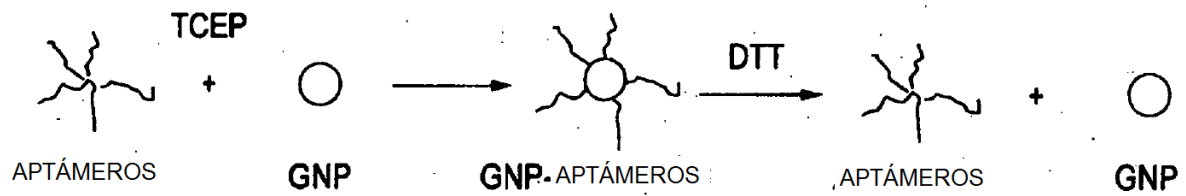


FIGURA 9B

ENSAYO MTT
CÉLULAS MDA-231 TRATADAS CON TAMAÑOS DIFERENTES DE GNP/ENLAZADOR
BARRAS = DESVIACIÓN ESTÁNDAR

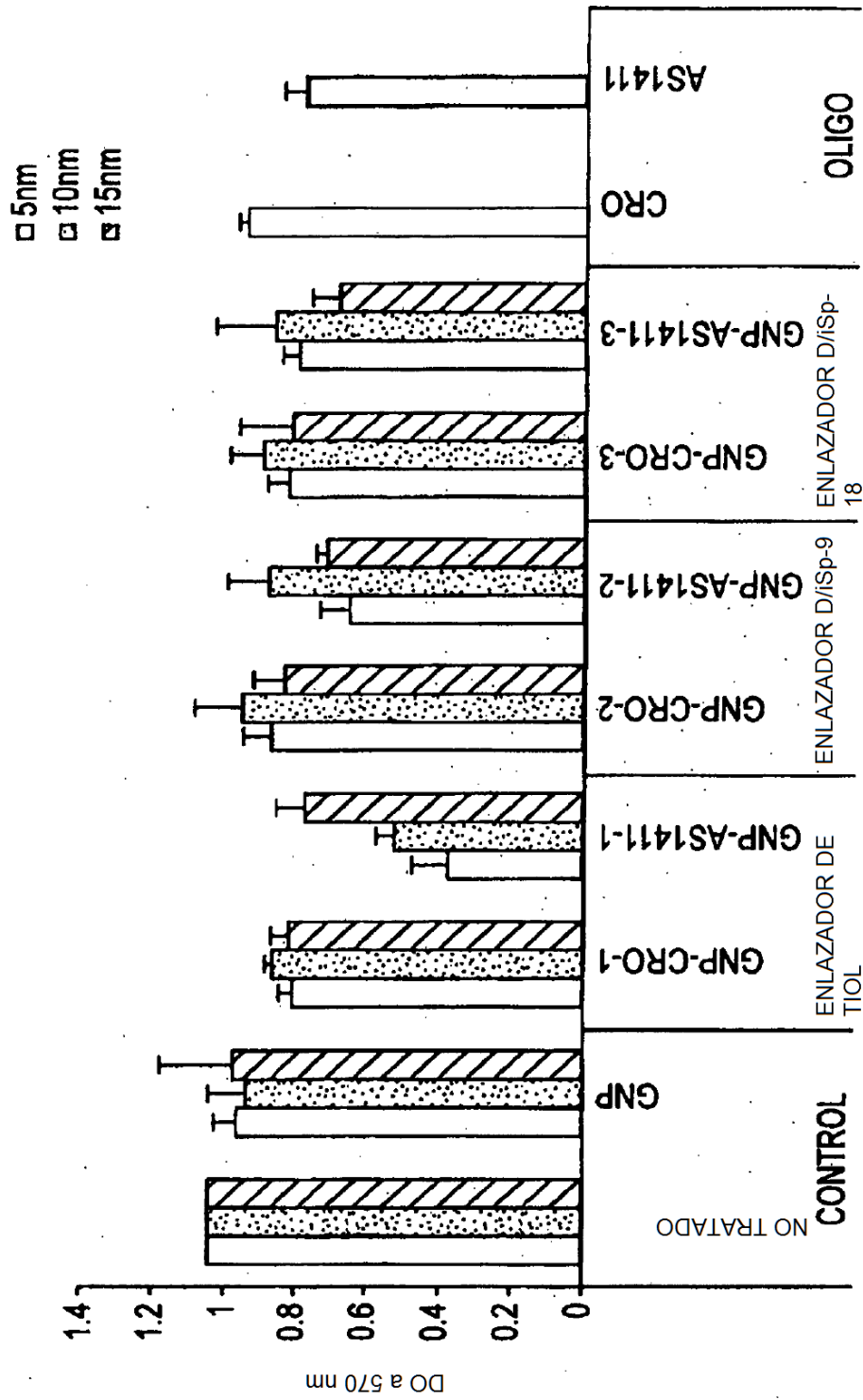
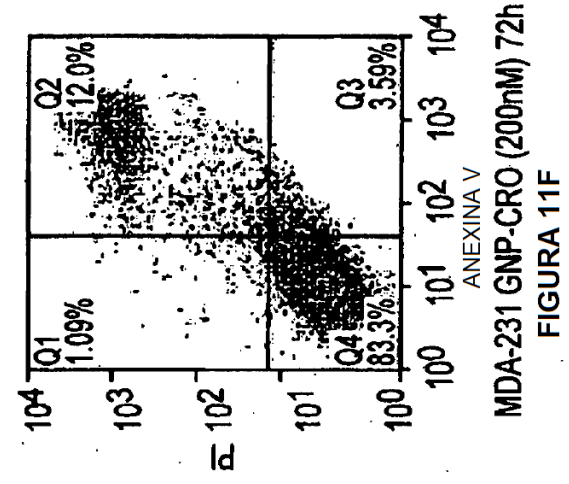
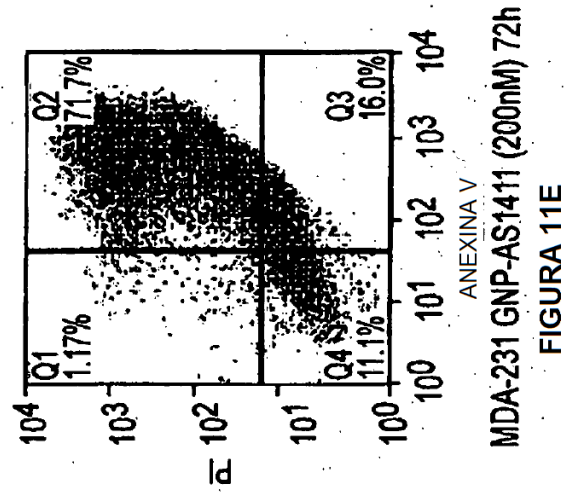
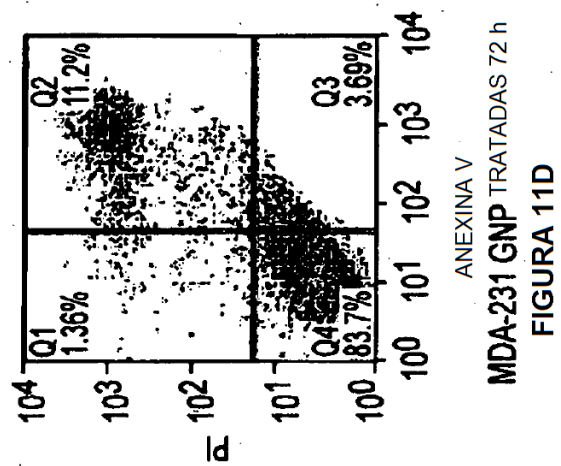
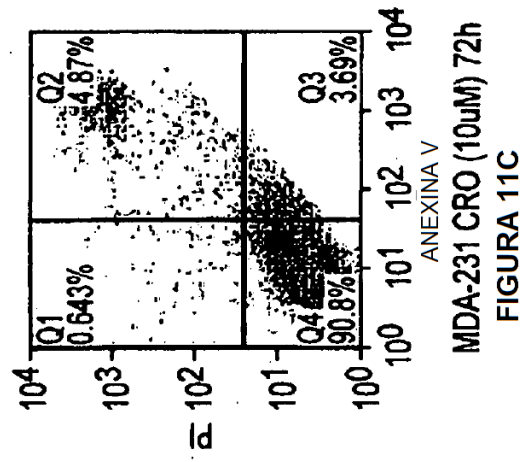
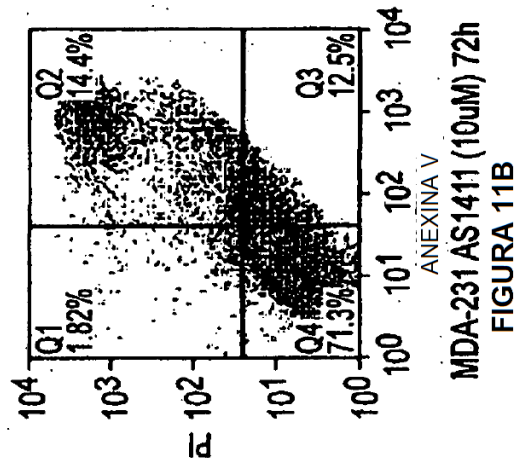
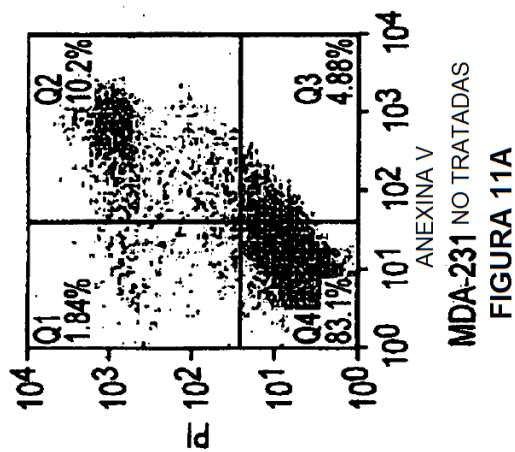
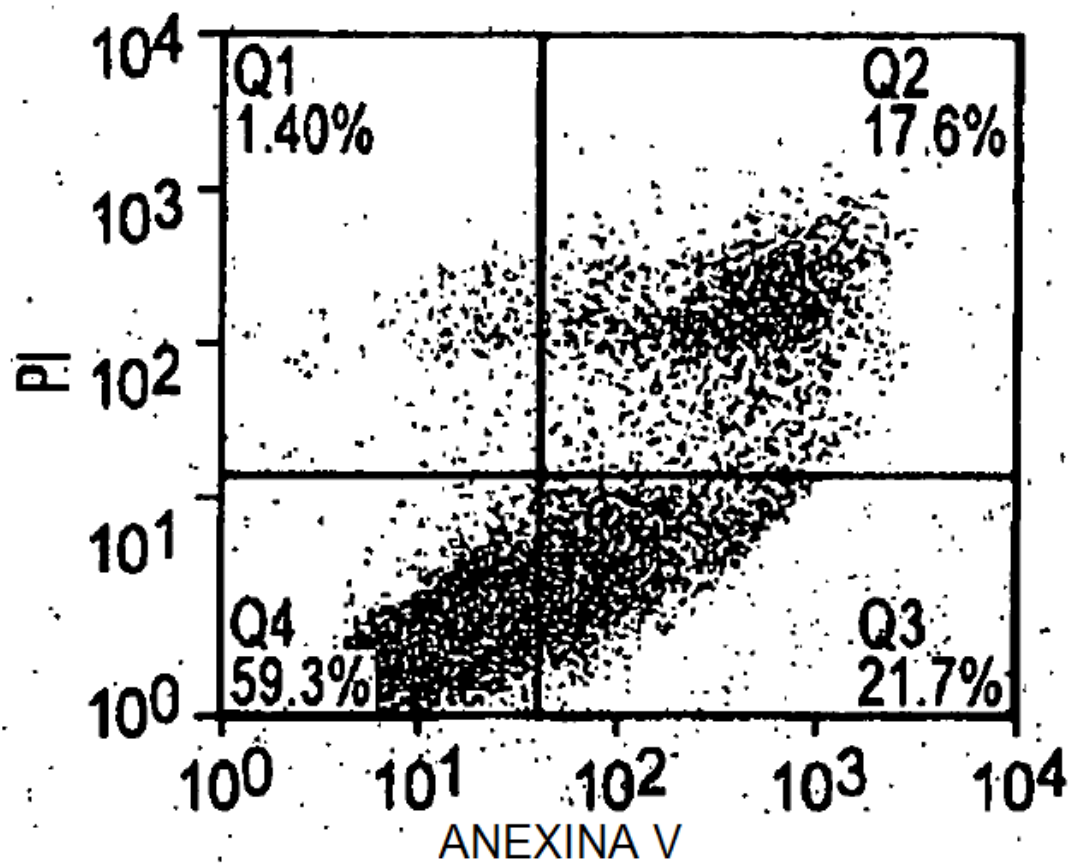


FIGURA 10





MDA-231 CAM 20h
FIGURA 11G

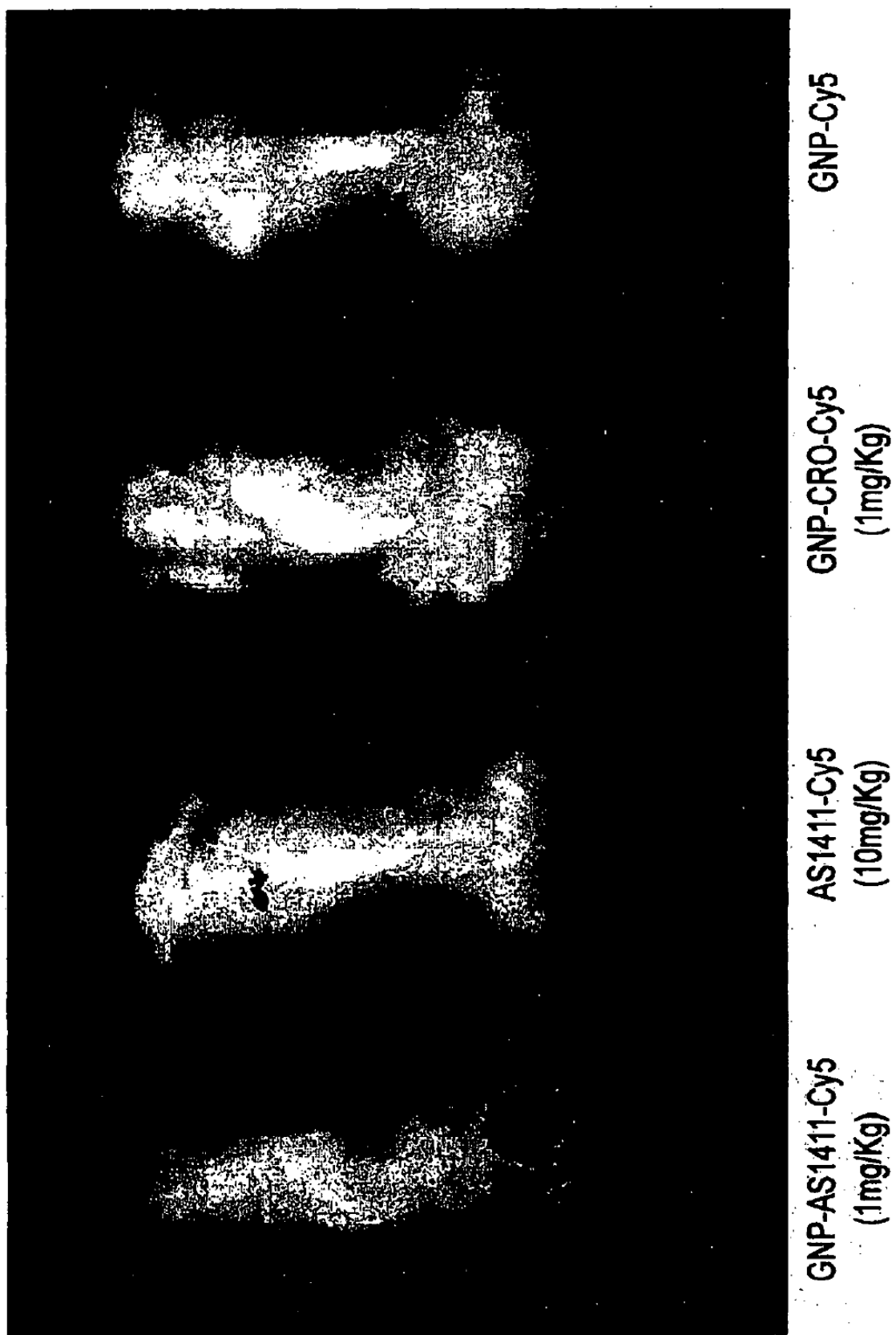


FIGURA 12

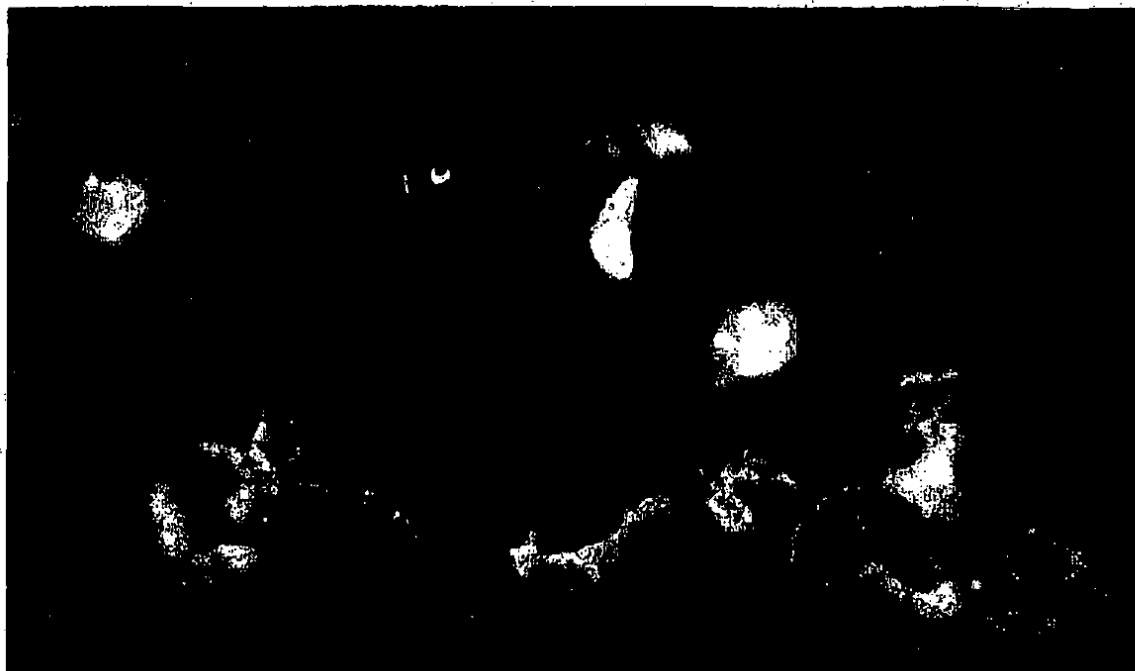


FIGURA 13A



FIGURA 13B