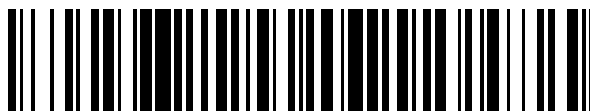


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 126**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 47/54** (2007.01)  
**A61K 47/69** (2007.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2014 PCT/EP2014/061762**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195432**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2014 E 14728205 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3003274**

54 Título: **Oligonucleótidos antisentido modificados hidrofóbicamente que comprenden una triple cadena alquílica**

30 Prioridad:  
**05.06.2013 WO PCT/IB2013/001516**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2020**

73 Titular/es:  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (20.0%);  
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (20.0%);  
INSTITUT JEAN PAOLI & IRÈNE CALMETTES (20.0%) y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (20.0%)**

72 Inventor/es:  
**BARTHELEMY, PHILIPPE;  
OUMZIL, KHALID;  
GISSOT, ARNAUD;  
ROCCHI, PALMA y  
ACUNZO, JULIE**

74 Agente/Representante:  
**SALVÀ FERRER, Joan**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 755 126 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos antisentido modificados hidrofóbicamente que comprenden una triple cadena alquílica

5 **[0001]** La presente invención se refiere a oligonucleótidos modificados hidrofóbicamente, el procedimiento de su fabricación, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos oligonucleótidos modificados y su uso como vehículos para la administración de fármacos.

**[0002]** Actualmente existe un interés sustancial en el uso de ácidos nucleicos para modificar la expresión génica con fines terapéuticos. El uso de análogos de oligonucleótidos (ON) como posibles agentes terapéuticos para modular la expresión de genes específicos ha demostrado ser prometedor para diferentes clases de moléculas, incluidos aptámeros, oligonucleótidos formadores de triplex, oligonucleótidos antisentido (ASO), pequeños ARN interferentes (siRNA) y antagomirs. Sin embargo, una barrera importante en la amplia utilización de los análogos de ON como fármacos clínicos es su capacidad reducida para atravesar las membranas celulares.

15 **[0003]** La captación celular y la localización de ON son problemas cruciales por sus efectos sobre las expresiones genéticas. La mayoría de las estrategias para su suministro celular implican portadores y/o polímeros lipófilos catiónicos. Si bien dichos portadores sintéticos pueden ser excepcionalmente efectivos para suministrar ADN plasmídico en el citoplasma de las células, la mayoría son de utilidad limitada debido a su toxicidad para las células y su baja eficiencia en el caso de los ON. Como alternativa, un resto lipófilo se ha unido covalentemente a las estructuras ON con el objetivo de mejorar la captación celular y la actividad antisentido. Los ON conjugados de lípidos (LON) presentan una secuencia de oligonucleótidos como la cabeza polar y al menos un resto lipídico insertado en el extremo 3' o 5' del oligonucleótido o dentro de la secuencia. Curiosamente, los LON se autoensamblan para dar agregados tales como micelas y vesículas. El segmento lipídico adjunto de los LON aporta nuevas propiedades a estos 20 tensoactivos, como actividades antisentido mejoradas, marcado de vesículas o bicapas lipídicas y membranas biológicas. Los LON también se han implementado con éxito en esquemas de detección originales de ácidos nucleicos y como herramientas biotecnológicas.

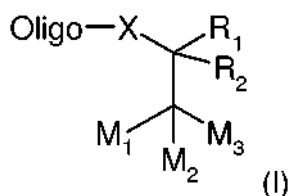
**[0004]** Sin embargo, los LON desarrollados hasta ahora tienen el inconveniente de llevar restos lipídicos no escindibles que podrían afectar la eficacia inhibitoria de los ON, una vez internalizados en las células diana.

**[0005]** Por lo tanto, todavía existe la necesidad de ON antisentido modificados alternativos con (i) una alta captación celular, (ii) una semivida prolongada en plasma y (iii) una alta eficiencia del silenciamiento génico *in vivo*.

35 **[0006]** La presente invención surge del hallazgo inesperado de los inventores de que un oligonucleótido antisentido modificado por sustitución en el extremo 5' o 3' por un resto que comprende tres cadenas de hidrocarburos, que pueden metabolizarse, tenía una potencia inhibitoria incrementada *in vivo* en comparación con el mismo ASO con otras modificaciones 5', incluso en ausencia de reactivo de transfección.

40 **[0007]** Además, los presentes inventores demostraron que estos LASO eran capaces de agregarse creando así un núcleo o depósito lipófilo, que podría usarse para la carga de fármacos hidrófobos, tales como paclitaxel, y que esta carga de fármaco podría modularse mediante la hibridación de la secuencia complementaria de ASO. Dichos agregados de LASO, por lo tanto, pueden usarse para desencadenar específicamente la liberación de un fármaco *in vivo*.

45 **[0008]** La presente invención se refiere, por tanto, a un oligonucleótido modificado de fórmula general (I):



50 en la que:

- Oligo representa una secuencia de oligonucleótidos antisentido que puede estar orientada 3'-5' o 5'-3', de ADN, ARN, monocatenario y/o comprende nucleótidos modificados;
- X representa un resto enlazador divalente seleccionado de -O- éter, tio -S-, amino-NH-, y metileno-CH<sub>2</sub>-;
- 55 • R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser idénticos o diferentes y representan:

- (i) un átomo de hidrógeno,
- (ii) un halógeno, en particular un átomo de flúor,
- (iii) un grupo hidroxilo,

(iv) un grupo alquilo que comprende de 1 a 12 átomos de carbono;

• M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> pueden ser idénticos o diferentes y representan:

- 5 - una cadena de hidrocarburos saturados o insaturados, lineales o ramificados, que comprende de 12 a 30 átomos de carbono, que puede estar sustituido en el átomo de carbono terminal por un grupo éster alifático o aromático, en particular bencílico o naftílico;
- un radical acilo con 12 a 30 átomos de carbono, o
- 10 - un grupo acilglicerol, esfingosina o ceramida,

para su uso como un medicamento.

**[0009]** Las presentes descripciones también describen un oligonucleótido modificado por sustitución en el extremo 3' o 5' por un resto que comprende al menos tres cadenas de hidrocarburos saturados o insaturados, lineales o ramificados, que comprenden de 2 a 30 átomos de carbono.

**[0010]** La presente descripción también describe un procedimiento de fabricación de un oligonucleótido modificado como se define en esta invención, que comprende las etapas de:

- 20 (i) sintetizar el oligonucleótido;
- (ii) modificar el oligonucleótido por reacción con un reactivo adecuado que comprende un resto que tiene tres cadenas de hidrocarburos saturados o insaturados, lineales o ramificados, que comprenden de 2 a 30 átomos de carbono;
- 25 (iii) recuperar el oligonucleótido modificado.

**[0011]** La presente descripción describe además un oligonucleótido antisentido modificado como se define en esta invención para su uso como un medicamento, en particular para su uso para el tratamiento del cáncer.

**[0012]** La presente descripción también describe una composición acuosa que comprende oligonucleótidos modificados como se define en esta invención, en la que los oligonucleótidos modificados se autoensamblan en micelas.

**[0013]** La presente descripción también describe el uso de esta composición acuosa como un vehículo.

35 **[0014]** La presente descripción también describe la composición acuosa definida en esta invención, que comprende un principio activo hidrófobo alojado en dichas micelas, para su uso como un medicamento, en particular para su uso para el tratamiento del cáncer.

#### Descripción detallada de la invención

40 *Oligonucleótido*

**[0015]** Como se usa en esta invención, el término «oligonucleótido» se refiere a una secuencia de ácido nucleico, orientada en 3'-5' o 5'-3', que puede ser monocatenaria bicatenaria. El oligonucleótido usado en el contexto de la invención puede ser en particular ADN o ARN.

**[0016]** Los oligonucleótidos usados en el contexto de la invención pueden modificarse adicionalmente, preferentemente modificarse químicamente, para aumentar la estabilidad y/o la eficacia terapéutica de los oligonucleótidos *in vivo*. En particular, el oligonucleótido usado en el contexto de la invención puede comprender 50 nucleótidos modificados.

**[0017]** Pueden producirse modificaciones químicas en tres sitios diferentes: (i) en grupos fosfato, (ii) en el resto de azúcar y/o (iii) en toda la estructura de la cadena principal del oligonucleótido.

55 **[0018]** Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden emplearse como derivados de fosforotioato (reemplazo de un átomo de oxígeno fosforilo no puente con un átomo de azufre) que tienen una mayor resistencia a la digestión de nucleasas. La modificación 2'-metoxietil (MOE) (tal como la cadena principal modificada comercializado por ISIS Pharmaceuticals) también es efectiva.

60 **[0019]** Además, o como alternativa, los oligonucleótidos de la invención pueden comprender nucleótidos modificados completa, parcialmente o en combinación, que son derivados con sustituciones en la posición 2' del azúcar, en particular con las siguientes modificaciones químicas: sustitución del grupo O-metilo (2'-O-Me), sustitución del grupo 2-metoxietilo (2'-O-MOE), sustitución del grupo fluoro (2'-fluoro), sustitución del grupo cloro (2'-Cl), sustitución del grupo bromo (2'-Br), sustitución del grupo cianuro (2'-CN), sustitución del grupo trifluorometilo (2'-CF<sub>3</sub>), 65 sustitución del grupo OCF<sub>3</sub> (2'-OCF<sub>3</sub>), sustitución del grupo OCN (2'-OCN), sustitución del grupo O-alquilo (2'-O-

alquilo), sustitución del grupo S-alquilo (2'-S-alquilo), sustitución del grupo N-alquilo (2'-N-alquilo), sustitución del grupo O-alqueno (2'-O-alqueno), sustitución del grupo S-alqueno (2'-S-alqueno), sustitución del grupo N-alqueno (2'-N-alqueno), sustitución del grupo SOCH<sub>3</sub> (2'-SOCH<sub>3</sub>), sustitución del grupo SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (2'-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), sustitución del grupo ONO<sub>2</sub> (2'-ONO<sub>2</sub>), sustitución del grupo NO<sub>2</sub> (2'-NO<sub>2</sub>), sustitución del grupo N<sub>3</sub> (2'-N<sub>3</sub>) y/o sustitución del grupo NH<sub>2</sub>(2'-NH<sub>2</sub>).

**[0020]** Además o como alternativa, los oligonucleótidos de la invención pueden comprender nucleótidos modificados completa o parcialmente en los que el resto ribosa se usa para producir ácido nucleico bloqueado (LNA), en el que se forma un puente covalente entre el oxígeno 2' y el carbono 4' de la ribosa, fijándola en la configuración 3'-endo. Estas construcciones son extremadamente estables en medio biológico, capaces de activar RNasa H y formar híbridos estrechos con ARN y ADN complementarios.

**[0021]** En consecuencia, en una realización preferida de la invención, el oligonucleótido usado en el contexto de la invención comprende nucleótidos modificados seleccionados del grupo que consiste en LNA, análogos 2'-OMe, análogos 2'-fosforotioato, análogos 2'-fluoro, análogos 2'-Cl, análogos 2'-Br, análogos 2'-CN, análogos 2'-CF<sub>3</sub>, análogos 2'-OCF<sub>3</sub>, análogos 2'-OCN, análogos 2'-O-alquilo, análogos 2'-S-alquilo, análogos 2'-N-alquilo, análogos 2'-O-alqueno, análogos 2'-S-alqueno, análogos 2'-N-alqueno, análogos 2'-SOCH<sub>3</sub>, análogos 2'-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, análogos 2'-ONO<sub>2</sub>, análogos 2'-NO<sub>2</sub>, análogos 2'-N<sub>3</sub>, análogos 2'-NH<sub>2</sub> y combinaciones de los mismos. Más preferentemente, los nucleótidos modificados se seleccionan del grupo que consiste en LNA, análogos 2'-OMe, análogos 2'-fosforotioato y análogos 2'-fluoro.

**[0022]** Además o como alternativa, algunas nucleobases del oligonucleótido pueden estar presentes como desoxirribosas. Esa modificación solo debería afectar el esqueleto de la nucleobase, en el que el grupo hidroxilo está ausente, pero no la cadena lateral de la nucleobase que permanece sin cambios. Dicha modificación generalmente favorece el reconocimiento del ARNi por el complejo DICER.

**[0023]** El oligonucleótido que se describe en esta invención puede corresponder, por ejemplo, a oligonucleótidos antisentido o a ARN interferentes (incluidos siRNA, shRNA, miRNA, dsRNA y otras especies de ARN que pueden escindirse *in vivo* para formar siRNA), que preferentemente se dirigen a ARNm de interés.

**[0024]** Como se usa en esta invención, un oligonucleótido que «se dirige» a un ARNm se refiere a un oligonucleótido que es capaz de unirse específicamente a dicho ARNm. Es decir, el oligonucleótido comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria, preferentemente perfectamente complementaria, a una región de la secuencia de dicho ARNm, siendo dicha complementariedad suficiente para producir una unión específica en condiciones intracelulares.

**[0025]** Como es inmediatamente evidente para los expertos en la materia, por una secuencia que es «perfectamente complementaria a» una segunda secuencia se entiende el homólogo del complemento inverso de la segunda secuencia, ya sea bajo la forma de una molécula de ADN o bajo la forma de una molécula de ARN. Una secuencia es «parcialmente complementaria a» una segunda secuencia si hay uno o más desajustes.

**[0026]** Preferentemente, el oligonucleótido de la invención se dirige a un ARNm que codifica la proteína tumoral controlada por traducción (TCTP), y es capaz de reducir la cantidad de TCTP en las células.

**[0027]** Los ácidos nucleicos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP pueden diseñarse usando la secuencia de dicho ARNm como base, por ejemplo, usando herramientas bioinformáticas. Por ejemplo, la secuencia de SEQ ID NO:5 puede usarse como base para diseñar ácidos nucleicos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP.

**[0028]** Preferentemente, los oligonucleótidos según la invención son capaces de reducir la cantidad de TCTP en las células, por ejemplo, en células cancerosas tales como las células LNCaP o PC3. Los expertos en la materia conocen procedimientos para determinar si un oligonucleótido es capaz de reducir la cantidad de TCTP en las células. Esto puede hacerse, por ejemplo, analizando la expresión de la proteína TCTP por transferencia Western, y comparando la expresión de la proteína TCTP en presencia y en ausencia del oligonucleótido a analizar.

**[0029]** Los oligonucleótidos según la invención tienen típicamente una longitud de 12 a 50 nucleótidos, por ejemplo, de 12 a 35 nucleótidos, de 12 a 30, de 12 a 25, de 12 a 22, de 15 a 35, de 15 a 30, de 15 a 25, de 15 a 22, de 18 a 22, o aproximadamente 19, 20 o 21 nucleótidos.

**[0030]** Los oligonucleótidos según la invención pueden comprender o consistir, por ejemplo, en 12 a 50 nucleótidos consecutivos, *por ejemplo*, de 12 a 35, de 12 a 30, de 12 a 25, de 12 a 22, de 15 a 35, de 15 a 30, de 15 a 25, de 15 a 22, de 18 a 22, o aproximadamente 19, 20 o 21 nucleótidos consecutivos de una secuencia complementaria al ARNm de la SEQ ID NO:5.

**[0031]** En particular, los inventores han identificado trece oligonucleótidos dirigidos a un ARNm que codifica

TCTP que son muy eficientes para reducir la cantidad de TCTP en las células. Estos oligonucleótidos se dirigen a las regiones que consisten en los nucleótidos 153 a 173 de la SEQ ID NO:5, los nucleótidos 220 a 240 de la SEQ ID NO:5, los nucleótidos 300 a 320 de la SEQ ID NO:5 y los nucleótidos 320 a 340 de la SEQ ID NO:5, respectivamente. Todos estos oligonucleótidos se dirigen a la región traducida del ARNm de TCTP (que se extiende desde el nucleótido 94 a 5 612 de la SEQ ID NO:5).

**[0032]** Por lo tanto, los oligonucleótidos según la invención se dirigen preferentemente a una secuencia que se solapa con los nucleótidos 153 a 173, o con los nucleótidos 221 a 240 o con los nucleótidos 300 a 340 de la SEQ ID NO:5, siendo dicho oligonucleótido un ADN o un ARN. Dicho oligonucleótido puede, por ejemplo, dirigirse a:

10

- una secuencia que consiste en los nucleótidos 153 a 173 o en los nucleótidos 221 a 240 o en los nucleótidos 300 a 320, o en los nucleótidos 320 a 340 de la SEQ ID NO:5, o

- una secuencia comprendida dentro de los nucleótidos 153 a 173 o dentro de los nucleótidos 221 a 240, o dentro de los nucleótidos 300 a 320, o dentro de los nucleótidos 320 a 340 de la SEQ ID NO:5, o

15

- una secuencia parcialmente comprendida dentro de los nucleótidos 153 a 173 o dentro de los nucleótidos 221 a 240, o dentro de los nucleótidos 300 a 320, o dentro de los nucleótidos 320 a 340 de la SEQ ID NO:5.

**[0033]** Los oligonucleótidos según la invención pueden comprender, por ejemplo, un fragmento de al menos

10 nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:2 (5'-

20 ACCAATGAGCGAGTCATCAA-3'), la SEQ ID NO:3 (5'-AACCCGUCCGCGAUCUCCCGG-3'), la SEQ ID NO:6 (5'-

AACTTGTTCCTGCAGGTGA-3'), la SEQ ID NO:7 (5'-TGGTTCATGACAATATCGAC-3'), la SEQ ID NO:8 (5'-

TAATCATGATGGCGACTGAA -3'), la SEQ ID NO:16 (5'-ACCAGTGATTACTGTGCTTT-3'), la SEQ ID NO:17 (5'-

CTTGAGGCTTCTTTGTGA-3'), la SEQ ID NO:18 (5'-ATG- TAATCTTTGATGACTT-3'), la SEQ ID NO:19 (5'-

GTTTCCCTTTGATTGATTTTC-3'), la SEQ ID NO:20 (5'- TTCTGGTCTCT- GTTCTTCAA-3'), la SEQ ID NO:25 (5'-

25 AGAAAATCATATATGGGGTC -3'), la SEQ ID NO:27 (5'- TTAACATTTCTCCATT- TCTA -3'), la SEQ ID NO:29 (5'-

GTCATAAAAGGTTTTACTCT-3') y la SEQ ID NO:31 (5'-GAAATTAGCAAGGATGTGCT- 3'). Más preferentemente,

los oligonucleótidos comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:2, la SEQ ID

NO:3, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la

SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20, la SEQ ID NO:25, la SEQ ID NO:27, la SEQ ID NO:29 y la SEQ ID NO:31. Los

30 oligonucleótidos según la invención, por ejemplo, puede comprender, por ejemplo, un fragmento de al menos 10

nucleótidos consecutivos de una secuencia de la SEQ ID NO:2 o de una secuencia de la SEQ ID NO:6, o de una

secuencia de la SEQ ID NO:7, o de una secuencia de la SEQ ID NO:3. Más preferentemente, comprenden una

secuencia de la SEQ ID NO:2, o una secuencia de la SEQ ID NO:6, o una secuencia de la SEQ ID NO:7 o una

secuencia de la SEQ ID NO:3. Aún preferentemente, los oligonucleótidos según la invención comprenden un

35 fragmento de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia de la SEQ ID NO:6. Lo más preferentemente,

comprenden una secuencia de la SEQ ID NO:6.

**[0034]** Según la invención, el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido.

40 **[0035]** Como se usa en esta invención el término «oligonucleótido antisentido» se refiere a un ADN o ARN

monocatenario con secuencia complementaria a su ARNm diana, y que se une a su ARNm diana evitando así

la traducción de proteínas, ya sea por impedimento estérico de la maquinaria ribosómica o por inducción de degradación

de ARNm por ribonucleasa H.

45 **[0036]** El oligonucleótido antisentido puede ser una molécula de ADN o ARN.

**[0037]** Dicho oligonucleótido antisentido puede comprender o consistir, por ejemplo, en un fragmento de al

menos 10, 12, 15, 18 o 20 nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ

50 ID NO:2 (5'-ACCAATGAGCGAGT- CATCAA-3'), la SEQ ID NO:6 (5'-AACTTGTTCCTGCAGGTGA-3'), la SEQ ID

NO:7 (5'-TGGTTCATGACAATATCGAC- 3'), la SEQ ID NO:8 (5'- TAATCATGATGGCGACTGAA -3'), la SEQ ID NO:16

(5'-ACCAGTGATTACTGTGCTTT-3'), la SEQ ID NO:17 (5'-CTTGAGGCTTCTTTGTGA-3'), la SEQ ID NO:18 (5'-

ATGTAATCTTTGATGACTT-3'), la SEQ ID NO:19 (5'-GTTTCCCTTTGATTGATTTTC-3'), la SEQ ID NO:20 (5'-

TTCTGGTCTCTGTTCTTCAA-3'), la SEQ ID NO:25 (5'- AGAAAATCATATATGGGGTC -3'), la SEQ ID NO:27 (5'-

TTAACATTTCTCCATTTCTA -3'), la SEQ ID NO:29 (5'- GTCAT- AAAAGGTTTTACTCT-3') y la SEQ ID NO:31 (5'-

55 GAAATTAGCAAGGATGTGCT-3'), preferentemente en la SEQ ID NO:2 (5'-ACCAATGAGCGAGTCATCAA-3'), o en

una secuencia de la SEQ ID NO:6 (5'-AACTTGTTCCTGCAGGTGA- 3'), o en una secuencia de la SEQ ID NO:7 (5'-

TGGTTCATGACAATATCGAC-3'). Preferentemente, comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo

que consiste en la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:16, la SEQ ID

NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO:20, la SEQ ID NO:25, la SEQ ID NO:27, la SEQ ID NO:29

60 y la SEQ ID NO:31, más preferentemente, del grupo que consiste en la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID

NO:7. Lo más preferentemente, comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO:6.

**[0038]** Como se describe en esta invención, el oligonucleótido puede ser un ARN interferente (ARNi).

65 **[0039]** La interferencia de ARN es un término acuñado inicialmente por Fire y sus colaboradores para describir

la observación de que el ARN bicatenario (dsRNA) puede bloquear la expresión génica cuando se introduce en gusanos (Fire y col., 1998, Nature 391:806-811). El dsRNA dirige el silenciamiento postranscripcional específico de genes en muchos organismos, incluidos los vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para estudiar la función de los genes. La interferencia de ARN implica la degradación de ARNm, pero muchos de los mecanismos bioquímicos subyacentes a esta interferencia son desconocidos. El uso de la interferencia de ARN se ha descrito adicionalmente en Carthew y col. (2001, Current Opinions in Cell Biology, 13:244-248) y en Elbashir y col. (2001, Nature, 411:494-498). Las moléculas de ARNi descritas en esta invención son ARN bicatenario o monocatenario, preferentemente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos, que median la inhibición de ARN. Es decir, el ARNi que se describe en esta invención preferentemente media en la degradación del ARNm que codifica TCTP.

**[0040]** El término «ARNi» incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado (ARN parcialmente purificado, ARN parcialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante), así como ARN alterado que difiere del ARN de origen natural en la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como en el(los) extremo(s) del ARN o en el interior (en uno o más nucleótidos del ARN). Los nucleótidos en las moléculas de ARNi que se describen en esta invención también pueden comprender nucleótidos no estándar, incluidos los nucleótidos de origen no natural o desoxirribonucleótidos. En conjunto, todos estos compuestos de ARNi alterados se denominan análogos o análogos de ARN de origen natural. El ARNi que se describe en esta invención solo debe ser lo suficientemente similar al ARN natural como para que tenga la capacidad de mediar la interferencia de ARN. Como se usa en esta invención, la frase «interferencia de ARN mediada» se refiere e indica la capacidad de distinguir qué ARNm se verá afectado por la maquinaria o procedimiento de interferencia de ARN. El ARN que media la interferencia de ARN interactúa con la maquinaria de interferencia de ARN de tal manera que dirige la maquinaria para degradar ARNm particulares o para reducir de otra manera la expresión de la proteína diana. En un ejemplo, la presente descripción describe moléculas de ARNi que dirigen la escisión de ARNm específico al que corresponde su secuencia. No es necesario que haya una correspondencia perfecta de las secuencias, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARNi dirija la inhibición de la interferencia de ARN por escisión o falta de expresión del ARNm diana.

**[0041]** Las moléculas de ARNi que se describen en esta invención pueden comprender una porción de ARN y alguna porción adicional, por ejemplo, una porción de desoxirribonucleótido. El número total de nucleótidos en la molécula de ARN es adecuadamente inferior a 49 para ser mediadores efectivos de la interferencia de ARN. En las moléculas de ARN preferidas, el número de nucleótidos es de 16 a 29, más preferentemente de 18 a 23, y lo más preferentemente de 21 a 23.

**[0042]** Como se indicó anteriormente, el término «ARNi» incluye pero no se limita a siRNA, shRNA, miRNA, dsRNA y otras especies de ARN que pueden escindirse *in vivo* para formar siRNA.

**[0043]** Un «ARN interferente corto» o «siRNA» comprende un dúplex de ARN (región bicatenaria) y puede comprender además uno o dos voladizos monocatenarios, voladizos 3' o 5'.

**[0044]** Un «ARN de horquilla corta (shRNA)» se refiere a un segmento de ARN que es complementario a una porción de un gen diana (complementario a uno o más transcritos de un gen diana) y tiene una estructura de tallo-bucle (horquilla).

**[0045]** Los «microARN» o «miRNA» son ARN codificados endógenamente que tienen aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, que regulan los genes diana tras la transcripción y generalmente se expresan de una manera altamente específica de tejido o de etapa de desarrollo. El investigador puede diseñar y expresar miRNA artificiales basados en las características de los genes de miRNA existentes. La arquitectura miR-30 (microRNA 30) puede usarse para expresar miRNA (o siRNA) a partir de plásmidos de expresión basados en el promotor de ARN polimerasa II (Zeng y col, 2005, Methods enzymol. 392:371-380). En algunos casos, las moléculas precursoras de miRNA pueden incluir más de una estructura de tallo-bucle. Las múltiples estructuras tallo-bucle pueden estar unidas entre sí a través de un enlazador, tal como, por ejemplo, un enlazador de ácido nucleico, una secuencia de flanqueo de miRNA, otras moléculas o alguna combinación de las mismas.

**[0046]** En un ejemplo preferido que se describe en esta invención, el ARNi comprende o consiste en un fragmento de al menos 10, 12, 15 o 18 nucleótidos consecutivos de una secuencia de la SEQ ID NO:3 (5'-AACCCGUCCGCGAUCUCCCGG-3'). Preferentemente, dicho ácido nucleico es un ARNi que comprende o que consiste en una secuencia de la SEQ ID NO:3. Más preferentemente, dicho ácido nucleico es un siRNA o un shRNA. La secuencia de la SEQ ID NO:3 puede modificarse y, por ejemplo, corresponder a una secuencia modificada de la SEQ ID NO:3 tal como una secuencia 5'-AACCCGUCCGCGAUCUCCCGdGdG-3'.

**[0047]** Los presentes inventores también demostraron que los oligonucleótidos modificados que comprenden un oligonucleótido que consiste en una adenina 15-mer de la secuencia SEQ ID NO:32 (dA<sub>15</sub>) o una timidina 15-mer de la secuencia SEQ ID NO:33 (dT<sub>15</sub>) fueron particularmente útiles para formar micelas capaces de encapsular fármacos.

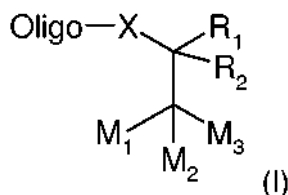
**[0048]** En consecuencia, en un ejemplo preferido, el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en dT<sub>15</sub>, dA<sub>15</sub> y un oligonucleótido que consiste en la secuencia SEQ ID NO:6.

### 5 Conjugado de lípidos

**[0049]** La presente descripción describe un oligonucleótido, tal como se define en la sección «*Oligonucleótido*» en esta invención anteriormente, modificado por sustitución en el extremo 3' o 5' por un resto que comprende al menos tres cadenas de hidrocarburos saturados o insaturados, preferentemente saturados, lineales o ramificados, preferentemente lineales, que comprenden de 2 a 30 átomos de carbono, preferentemente de 5 a 20 átomos de carbono, más preferentemente de 10 a 18 átomos de carbono.

**[0050]** En un ejemplo preferido que se describe en esta invención, el oligonucleótido modificado es de la fórmula general (I):

15



en la que:

20 • Oligo representa una secuencia de oligonucleótidos que puede estar orientada 3'-5' o 5'-3', de ADN, ARN, monocatenario y/o bicatenario, y/o comprende nucleótidos modificados, en particular un oligonucleótido como se define en la sección «*Oligonucleótido*» en esta invención anteriormente;

• X representa un resto enlazador divalente seleccionado de -O- éter, tio -S-, amino-NH-, y metileno-CH<sub>2</sub>-;

25 • R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser idénticos o diferentes y representan:

- (i) un átomo de hidrógeno,
- (ii) un halógeno, en particular un átomo de flúor,
- (iii) un grupo hidroxilo,

30 (iv) un grupo alquilo que comprende de 1 a 12 átomos de carbono;

• M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> pueden ser idénticos o diferentes y representan:

35 - una cadena de hidrocarburos saturados o insaturados, preferentemente saturados, lineales o ramificados, preferentemente lineales, que comprenden de 2 a 30 átomos de carbono, preferentemente de 6 a 22 átomos de carbono, más preferentemente de 12 a 20 átomos de carbono; que pueden estar sustituidos con uno o más átomos de halógeno, en particular estar fluorados o perfluorados y/o estar interrumpidos por uno o más grupos seleccionados de entre grupos -O- éter, tio -S-, amino -NH-, oxicarbonil -OC (O) -, tiocarbamato -OC (S) -NH-, carbonato -OC (O) -O-, carbamato -OC (O) -NH-, fosfato -OP (O) (O) -O- y fosfonato -PO (O) (O); y/o estar

40 sustituidos en el átomo de carbono terminal por un grupo éster alifático o aromático, en particular bencílico o naftílico;

- un radical acilo con 2 a 30 átomos de carbono, preferentemente con 6 a 22 átomos de carbono, más preferentemente con 12 a 20 átomos de carbono, o

- un grupo acilglicerol, esfingosina o ceramida.

45

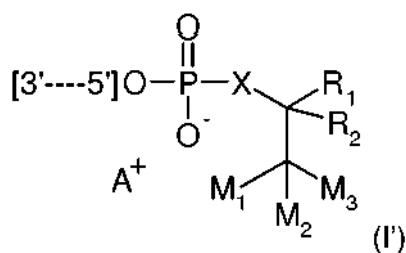
**[0051]** En el contexto de la invención, el término «alquilo» se refiere a una cadena de hidrocarburos que puede ser una cadena lineal o ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, el alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> indica que el grupo puede tener de 1 a 12 átomos de carbono (inclusive) en ella.

50 **[0052]** En el contexto de la invención, el término «acilo» se refiere a un sustituyente alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, arilcarbonilo, heterociclicarbonilo o heteroarilcarbonilo.

**[0053]** Preferentemente, la secuencia de oligonucleótidos «oligo-» está conectada al resto enlazador divalente X a través de un resto fosfato -O-P(=O)(O<sup>-</sup>)-, en su extremo 3' o 5', ventajosamente en su extremo 5'.

55

**[0054]** En un ejemplo preferido que se describe en esta invención, el oligonucleótido modificado es de la fórmula general (I):



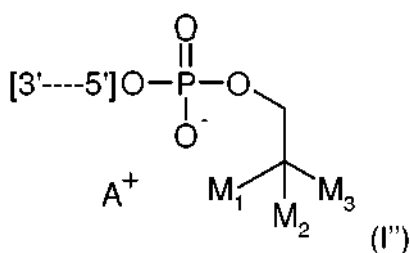
en la que:

- 5 - X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> son como se definen anteriormente en la fórmula (I),  
 - [3'—5'] representa, junto con el resto PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, un oligonucleótido como se define en la sección «*Oligonucleótido*» en esta invención anteriormente, y  
 - A<sup>+</sup> representa un catión, preferentemente H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

10 **[0055]** En las fórmulas (I) y (I'), el resto enlazador divalente es preferentemente -O- éter.

**[0056]** En las fórmulas (I) y (I'), R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son preferentemente átomos de hidrógeno.

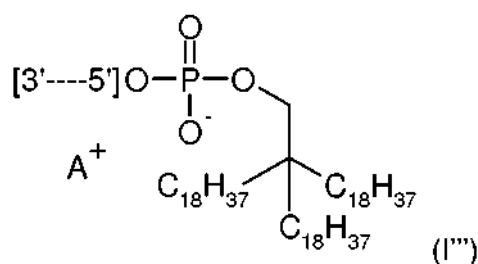
**[0057]** En un ejemplo preferido que se describe en esta invención, el oligonucleótido modificado es de la  
 15 fórmula (I'')



en la que A<sup>+</sup>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> son como se definen anteriormente en la fórmula (I) y [3'---5'] representa, junto con el resto  
 20 PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, un oligonucleótido antisentido como se define en la sección «*Oligonucleótido*» en esta invención anteriormente.

**[0058]** En las fórmulas (I) y (I') e (I''), M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> representan preferentemente una cadena de hidrocarburos, preferentemente una cadena de hidrocarburos lineal, que comprende de 6 a 22 átomos de carbono, preferentemente de 12 a 20 átomos de carbono, más preferentemente 18 átomos de carbono.

25 **[0059]** En una realización preferida según la invención, el oligonucleótido modificado es de la fórmula general (I''')



30 en la que A<sup>+</sup> es como se define anteriormente en la fórmula (I) y [3'---5'] representa, junto con el resto PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, un oligonucleótido como se define en la sección «*Oligonucleótido*» en esta invención anteriormente.

**[0060]** En la fórmula (I'''), las cadenas -C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> son preferentemente cadenas de alquilo rectas.

35 *Procedimiento de fabricación*

**[0061]** La presente descripción también describe un procedimiento de fabricación de un oligonucleótido modificado como se define en lo anterior, que comprende las etapas de:

- 40 (i) sintetizar el oligonucleótido, como se define en la sección «*Oligonucleótido*» en esta invención anteriormente;



(ii) modificar el oligonucleótido por reacción con un reactivo adecuado que comprende un que tiene al menos tres cadenas de hidrocarburos saturados o insaturados, preferentemente saturados, lineales o ramificados, preferentemente lineales, que comprenden de 2 a 30 átomos de carbono, preferentemente de 6 a 22 átomos de carbono, más preferentemente de 12 a 20 átomos de carbono;

5 (iii) recuperar el oligonucleótido modificado.

**[0062]** Preferentemente, el reactivo adecuado de la etapa (ii) comprende un resto de fórmula  $-C(M_1)(M_2)(M_3)$ , en la que  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$  son como se definen anteriormente en la fórmula (I).

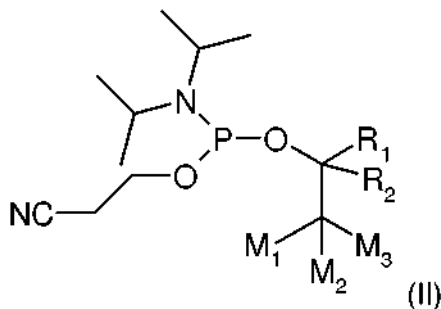
10 **[0063]** La etapa (ii) se lleva a cabo generalmente usando una metodología de acoplamiento.

**[0064]** Según un ejemplo preferido del procedimiento que se describe en esta invención, la etapa (ii) se lleva a cabo usando la metodología de fosforamidita, que es bien conocida para la síntesis de oligonucleótidos.

15 **[0065]** Preferentemente, el reactivo usado en la etapa (ii) comprende un grupo fosforamidita.

**[0066]** Un «grupo fosforamidita» se refiere a una monoamida de un resto diéster de fosfito que se puede representar como sigue  $>N-P(-O)_2$ .

20 **[0067]** El reactivo usado en la etapa (ii) es preferentemente de fórmula (II):



en la que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$  son como se definen anteriormente en la fórmula (I).

25

**[0068]** Cuando el reactivo comprende un grupo fosforamidita, la etapa (ii) generalmente se lleva a cabo en presencia de un agente de acoplamiento, tal como N-benciltiotetrazol, que activa la fosforamidita. A continuación se añade el oligonucleótido sintetizado en la etapa (i), que comprende ventajosamente un extremo OH 5', y se produce el acoplamiento.

30

**[0069]** El oligonucleótido modificado de la invención se obtiene a continuación según procedimientos habituales bien conocidos en el marco de la síntesis de oligonucleótidos.

#### Composiciones acuosas

35

**[0070]** La presente descripción también proporciona una composición acuosa que comprende oligonucleótidos modificados como se define en lo anterior, en la que los oligonucleótidos modificados se autoensamblan en micelas.

40 **[0071]** Una micela es un agregado de moléculas tensioactivas dispersas en un coloide líquido. Una micela típica en solución acuosa forma un agregado con las regiones hidrófilas de «cabeza» de las moléculas en contacto con el disolvente acuoso circundante, secuestrando las regiones hidrófobas de «cola» de las moléculas en el centro de la micela.

45 **[0072]** Los oligonucleótidos modificados se autoensamblan en micelas que tienen una estructura de núcleo/cubierta, en la que la cubierta es hidrófila y está formada por las partes oligonucleotídicas de los oligonucleótidos modificados, y en la que el núcleo es lipófilo y está formado por cadenas de hidrocarburos saturados o insaturados, lineales o ramificados en los  $C_2$ - $C_{30}$  de los oligonucleótidos modificados.

50 **[0073]** Las composiciones acuosas pueden comprender hasta 50 % en peso de oligonucleótidos modificados, preferentemente de 0,1 % a 40 %, en particular de 1 % a 20 %, y especialmente de 8 % a 15 % en peso de oligonucleótidos modificados.

**[0074]** Según un ejemplo preferido, la composición acuosa que se describe en esta invención comprende además un principio activo hidrófobo alojado en dichas micelas.

55

**[0075]** Dichas micelas pueden usarse para la carga de fármacos hidrófobos. La carga de dichas micelas con fármaco hidrófobo puede variar entre 2  $\mu\text{M}$  y 2 mM.

**[0076]** El principio activo hidrófobo se selecciona preferentemente del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinorelbina y abraxane; tamoxifeno, agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), antagonista del receptor de andrógenos (AR) y antagonistas del receptor de estrógenos (ER); ciclofosfamida, clorambucilo y melfalan; metotrexato, citarabina, fludarabina, 6-mercaptopurina y 5-fluorouracilo; doxorubicina, irinotecán, derivados de platino, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino; bicalutamida, anastrozol, examestano y letrozol; imatinib (Gleevec), gefitinib y erlotinib; rituximab, trastuzumab (Herceptin) y gemtuzumab ozogamicina; interferón alfa; tretinoína y trióxido de arsénico; bevicizumab, serafinib y sunitinib.

**[0077]** Más preferentemente, el principio activo hidrófobo es paclitaxel.

#### *Uso como vehículo*

**[0078]** La presente descripción también describe uso de una composición acuosa como se define en la sección «Composición acuosa» en lo anterior como un vehículo.

**[0079]** Como se usa en esta invención, el término «vehículo» se refiere a un portador de una sustancia medicinal y/o farmacéuticamente activa.

**[0080]** Preferentemente, la composición acuosa como se define en la sección «Composición acuosa» en lo anterior se usa como un portador de principio activo poco hidrosoluble.

**[0081]** Dicho vehículo es especialmente útil para la administración de dicha sustancia activa por medio de vías intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral, o inyección hemoral directa.

**[0082]** El principio activo se selecciona preferentemente del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinorelbina y abraxane; tamoxifeno, agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), antagonista del receptor de andrógenos (AR) y antagonistas del receptor de estrógenos (ER); ciclofosfamida, clorambucilo y melfalan; metotrexato, citarabina, fludarabina, 6-mercaptopurina y 5-fluorouracilo; doxorubicina, irinotecán, derivados de platino, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino; bicalutamida, anastrozol, examestano y letrozol; imatinib (Gleevec), gefitinib y erlotinib; rituximab, trastuzumab (Herceptin) y gemtuzumab ozogamicina; interferón alfa; tretinoína y trióxido de arsénico; bevicizumab, serafinib y sunitinib.

**[0083]** Más preferentemente, el principio activo hidrófobo es paclitaxel.

#### *Indicaciones médicas*

**[0084]** Los inventores han descubierto que los siRNA y los oligonucleótidos antisentido dirigidos a TCTP inhiben la progresión resistente a la castración de células y xenoinjertos PC3, LNCaP y C4-2 y mejoran la sensibilidad al docetaxel y la castración. Por lo tanto, la presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido modificado según la invención, en particular un oligonucleótido que se dirige a un ARNm que codifica TCTP, para su uso como un medicamento, más particularmente para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer, preferentemente cáncer resistente a hormonas y/o a quimioterapia. La presente invención también proporciona un oligonucleótido antisentido modificado según la invención, más particularmente un oligonucleótido que se dirige a un ARNm que codifica TCTP, para su uso en la restauración de la sensibilidad a la terapia hormonal y quimioterápica en un paciente que padece cáncer.

**[0085]** La descripción también describe el uso de un oligonucleótido modificado como se define en lo anterior, en particular un oligonucleótido antisentido modificado, en particular un oligonucleótido que se dirige a un ARNm que codifica TCTP, para la fabricación de un medicamento, en particular para la fabricación de un medicamento destinado a tratar o evitar el cáncer, preferentemente el cáncer resistente a hormonas y/o a quimioterapia. La descripción también describe el uso de un oligonucleótido modificado como se define en lo anterior, en particular un oligonucleótido antisentido modificado, más particularmente un oligonucleótido que se dirige a un ARNm que codifica TCTP, para la fabricación de un medicamento destinado a restaurar la sensibilidad a la terapia hormonal y quimioterápica en un paciente que padece cáncer.

**[0086]** La descripción también describe un procedimiento para tratar o evitar el cáncer y/o para restaurar la sensibilidad a la terapia hormonal y quimioterápica que comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de un oligonucleótido modificado, en particular un oligonucleótido antisentido modificado como se define en lo anterior, más particularmente un oligonucleótido que dirige un ARNm que codifica TCTP a un individuo que lo necesita.

**[0087]** Como se usa en esta invención, el término «cáncer» se refiere a cualquier tipo de tumor maligno (es decir, no benigno). El tumor puede corresponder a un tumor maligno sólido, que incluye, por ejemplo, carcinomas,

adenocarcinomas, sarcomas, melanomas malignos, mesoteliomas, blastomas o un cáncer de sangre tal como leucemias, linfomas y mielomas. El cáncer puede corresponder, por ejemplo, a un cáncer de próstata avanzado, un cáncer de páncreas, un cáncer de vejiga, un cáncer de ovario, un cáncer de testículos, un adenoma cortical, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama o un cáncer de hígado.

5

**[0088]** Los cánceres que se tratan preferentemente según la invención son aquellos en los que TCTP se expresa a niveles más altos en células cancerosas que en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de hígado, eritroleucemia, gliomas, melanomas, hepatoblastomas y linfomas.

10

**[0089]** Se cree que los oligonucleótidos según la invención, en particular los oligonucleótidos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP, son capaces de retrasar o evitar la aparición de un fenotipo resistente independiente de la hormona y de revertir un fenotipo resistente independiente de la hormona. Por lo tanto, son particularmente adecuados para su uso en el tratamiento de un cáncer independiente de hormonas o de un cáncer dependiente de hormonas en el que se espera que se produzca una independencia hormonal. El término «castración» en la expresión «resistente a la castración» o «independencia de la castración» según la invención se refiere a «hormona» y corresponde a «resistente a la hormona» o «independencia de la hormona». La independencia de andrógenos se refiere a una independencia de hormonas. En efecto, un cáncer de próstata independiente de andrógenos (AIPC) es un cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC).

20

**[0090]** Por lo tanto, una realización preferida de la invención se dirige a un oligonucleótido según la invención, en particular un oligonucleótido que se dirige a un ARNm que codifica TCTP, para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer independiente de hormonas o resistente a la quimioterapia.

25

**[0091]** Dado que los oligonucleótidos según la invención, en particular los oligonucleótidos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP, son capaces de restaurar la sensibilidad a los fármacos, son particularmente adecuados para su uso en el tratamiento de cánceres avanzados o cánceres resistentes a la quimioterapia. Los oligonucleótidos según la invención, en particular los oligonucleótidos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP, pueden usarse especialmente como terapia de segunda línea.

30

**[0092]** El experto en la materia es capaz de determinar si un cáncer es un cáncer «avanzado» utilizando procedimientos de clasificación bien conocidos, tales como, por ejemplo, el grado o la clasificación TNM. Por ejemplo, se puede usar el grado (G1-4) de las células cancerosas. Más específicamente, las células cancerosas son de «bajo grado» si parecen similares a las células normales, y de «alto grado» si parecen poco diferenciadas. Por ejemplo, los cánceres G3 o G4 se clasificarían como cánceres avanzados. Además o como alternativa, se puede usar la clasificación TNM. En esta clasificación, T (a, es, (0), 1-4) indica el tamaño o extensión directa del tumor primario, N (0-3) indica el grado de diseminación a los ganglios linfáticos regionales y M (0/1) indica la presencia de metástasis. Por ejemplo, un cáncer T4/N3/M1 se clasificaría como un cáncer avanzado.

40

**[0093]** Lo más preferentemente, el cáncer es un cáncer de próstata, por ejemplo, un cáncer de próstata avanzado y/o un cáncer de próstata independiente de andrógenos. En una realización específica, los cánceres de próstata dependientes de andrógenos pueden excluirse del alcance de los cánceres a tratar en el marco de la presente invención.

45

**[0094]** Los inventores han descubierto además que los oligonucleótidos antisentido según la invención mejoraron los efectos anticancerígenos de la quimioterapia con docetaxel tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, se cree que los antagonistas según la invención son capaces de revertir un fenotipo resistente a la castración y de restaurar la sensibilidad a los fármacos. Por lo tanto, los oligonucleótidos según la invención, en particular los oligonucleótidos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP, pueden usarse ventajosamente (simultánea o secuencialmente) en combinación con al menos un segundo agente anticancerígeno (*por ejemplo*, en el marco de una quimioterapia).

50

**[0095]** En particular, los oligonucleótidos según la invención, en particular los oligonucleótidos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP, pueden usarse en el marco de una quimioterapia de combinación. Los oligonucleótidos según la invención, en particular los oligonucleótidos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP, pueden usarse, por ejemplo (simultánea o secuencialmente) en combinación con al menos uno de los siguientes agentes anticancerígenos:

60

- un agente antimetabólico tal como docetaxel, vincristina, paclitaxel (Taxol), vinorelbina y abraxane;
- un fármaco de terapia hormonal, usándose dichos fármacos comúnmente en el marco del tratamiento de cánceres sensibles a las hormonas. Los fármacos de terapia hormonal incluyen, *por ejemplo*, tamoxifeno, agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), antagonista del receptor de andrógenos (AR) y antagonistas del receptor de estrógenos (ER);
- un agente alquilante tal como ciclofosfamida, clorambucilo y melfalan;

65

- un antimetabolito tal como metotrexato, citarabina, fludarabina, 6-mercaptopurina y 5-fluorouracilo;

- un inhibidor de topoisomerasa tal como doxorrubicina, irinotecán, derivados de platino, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino;
- un inhibidor de aromatasas tal como bicalutamida, anastrozol, exemestano y letrozol;
- un inhibidor de señalización tal como imatinib (Gleevec), gefitinib y erlotinib;
- 5 - un anticuerpo monoclonal tal como rituximab, trastuzumab (Herceptin) y gemtuzumab ozogamicina;
- un modificador de respuesta biológica tal como el interferón alfa;
- un agente diferenciador tal como tretinoína y trióxido de arsénico; y/o
- un agente que bloquea la formación de vasos sanguíneos (agentes antiangiogénicos) tal como bevacizumab, serafinib y sunitinib.

10

**[0096]** Además, el procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer que se describe en esta invención puede estar asociado con una radioterapia, cirugía y/o retirada de andrógenos.

**[0097]** La administración de oligonucleótidos según la invención, en particular de oligonucleótidos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP, se puede llevar a cabo utilizando diversos mecanismos conocidos en la técnica, que incluyen la administración y la administración desnuda en portadores o nanopartículas de lípidos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los portadores de lípidos para el suministro antisentido se describen en las patentes de los EE. UU. n.º 5.855.911 y 5.417.978.

15 **[0098]** Se pueden administrar, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral, o por inyección local directa del tumor.

**[0099]** El oligonucleótido se administra en una «cantidad efectiva», es decir, en una cantidad suficiente para tratar o evitar el cáncer. Se apreciará que esta cantidad variará tanto con la efectividad de los oligonucleótidos u otro agente terapéutico empleado, como con la naturaleza de cualquier portador utilizado. La determinación de las cantidades adecuadas para cualquier composición dada está dentro de la habilidad en la técnica, a través de series estándar de pruebas diseñadas para evaluar los niveles terapéuticos adecuados.

20 **[0100]** En el marco de la presente invención, el individuo es preferentemente un individuo humano. Sin embargo, también se prevé el uso veterinario del antagonista según la presente invención. Por lo tanto, el individuo también puede corresponder a un individuo no humano, preferentemente un mamífero no humano.

**[0101]** El término «tratar» significa un procedimiento terapéutico, es decir, un procedimiento destinado a curar, mejorar la afección y/o extender el tiempo de vida de un individuo que padece cáncer.

35

**[0102]** Por «evitar» se entiende un procedimiento profiláctico, *por ejemplo*, con el objetivo de reducir el riesgo de recaída y/o reducir el riesgo de aparición de una independencia hormonal.

**[0103]** El cáncer de próstata es un cáncer que sobreexpresa TCTP en cánceres avanzados, y en particular en cánceres que se han vuelto resistentes a la castración. Para el tratamiento del cáncer de próstata, los oligonucleótidos según la invención, en particular los oligonucleótidos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP, se administran adecuadamente después de la retirada inicial de andrógenos. El inicio de la retirada de andrógenos se puede lograr mediante la castración quirúrgica (extirpación de ambos testículos) o médica (supresión de testosterona inducida por fármacos), que actualmente está indicada para el tratamiento del cáncer de próstata. La castración médica puede lograrse mediante diversos regímenes, incluidos los agentes de LHRH o los antiandrógenos (véase, por ejemplo, Cleave y col., 1999, CMAJ 160:225-232). La terapia intermitente en la que se puede realizar la retirada reversible de andrógenos como se describe en Cleave y col. (1998, Eur. Urol. 34:37-41).

40 **[0104]** La inhibición de TCTP, en particular de la expresión de TCTP por los oligonucleótidos según la invención, puede ser transitoria. Para el tratamiento del cáncer de próstata, la inhibición de TCTP idealmente debería producirse coincidiendo con la retirada de andrógenos. En seres humanos, esto significa que la inhibición de TCTP debería ser efectiva comenzando en un día o dos después de la retirada de andrógenos (antes o después) y extendiéndose durante aproximadamente 3 a 6 meses. Esto puede requerir múltiples dosis para lograrlo. Sin embargo, se apreciará que el período de tiempo puede ser más prolongado, comenzando antes de la castración y empleando un tiempo considerable después sin apartarse del alcance de la invención.

50 **[0105]** Los presentes inventores también demostraron que los oligonucleótidos modificados que se describen en esta invención eran capaces de formar micelas que encapsulaban principios activos hidrófobos, que podían liberar su contenido cuando se hibridaban con sus secuencias complementarias (figura 2). En consecuencia, las composiciones acuosas que se describen en esta invención son útiles para suministrar específicamente principios activos a células de interés para tratar una enfermedad.

60 **[0106]** La presente descripción también describe, por lo tanto, una composición acuosa como se define en la sección «Composición acuosa» en lo anterior, para su uso como un medicamento, en particular para su uso para tratar el cáncer, como se define anteriormente.

65

**[0107]** La presente descripción también describe el uso de una composición acuosa como se define en la sección «Composición acuosa» en lo anterior, para la fabricación de un medicamento, en particular destinado a tratar o evitar el cáncer, como se define anteriormente.

5

**[0108]** La presente descripción también describe un procedimiento para tratar o evitar el cáncer, como se define anteriormente, que comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de una composición acuosa según la descripción como se define en la sección «Composición acuosa» en lo anterior, a un individuo que lo necesite.

#### 10 Composiciones farmacéuticas

**[0109]** La presente descripción también describe una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido modificado que se describe en esta invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 **[0110]** Los expertos en la materia conocen las composiciones farmacéuticas formuladas de una manera adecuada para la administración de oligonucleótidos. Por ejemplo, los portadores lipídicos (en particular los liposomas) son portadores farmacéuticamente aceptables particularmente adecuados cuando se administra un oligonucleótido que se describe en esta invención.

20 **[0111]** Los ejemplos no limitantes de portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la formulación con el oligonucleótido que se describen en esta invención incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG, ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos, ácidos nucleicos que contienen restos lipófilos, fosforotioatos, inhibidores de la glicoproteína P (tal como Pluronic P85) que pueden mejorar la entrada de fármacos en diversos tejidos, polímeros biodegradables (tales como las microesferas de poli(DL-lactida-co-glicólido)) para el suministro de liberación sostenida  
25 después de la implantación, y nanopartículas cargadas (tales como las hechas de poliácido acrílico de butilo).

**[0112]** La descripción también describe una composición farmacéutica que comprende liposomas de superficie modificada que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (modificados con PEG, ramificados y no ramificados o combinaciones de los mismos, o liposomas de circulación larga o liposomas furtivos). Los oligonucleótidos que se describen en esta invención también pueden comprender moléculas de PEG unidas covalentemente de diversos pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un procedimiento para aumentar la acumulación de fármacos en los tejidos diana. Esta clase de portadores de fármacos resiste la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), lo que permite tiempos de circulación sanguínea más largos y una mejora de la exposición de los tejidos al fármaco encapsulado (Lasic y col., 1995, Chem. Rev., 95:2601-2627; Ishiwata y col., 1995, Chem. Pharm. Bull., 43:1005-1011). Se ha demostrado que dichos liposomas se acumulan selectivamente en tumores, presumiblemente por extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic y col., 1995, Science, 267:1275-1276; Oku y col., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238:86-90). Los liposomas de circulación larga mejoran la farmacocinética y farmacodinámica del ADN y el ARN. También es probable que los liposomas de circulación larga protejan a los fármacos de la degradación de nucleasas en mayor medida en comparación con los liposomas catiónicos.  
40

**[0113]** La composición farmacéutica que se describe en esta invención puede comprender estabilizadores, tampones y similares. Cuando se desea utilizar un mecanismo de suministro de liposomas, se pueden seguir los protocolos estándar para la formación de liposomas. Las composiciones que se describen en esta invención pueden formularse y usarse como comprimidos, cápsulas o elixires para la administración por vía oral, supositorios para la administración por vía rectal, soluciones o suspensiones estériles para la administración inyectable.  
45

**[0114]** La elección de la formulación depende en última instancia de la forma de administración prevista, tal como, por ejemplo, una forma de administración por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral, o una administración por vía local mediante inyección tumoral. Preferentemente, la composición farmacéutica que se describe en esta invención es una solución o suspensión, *por ejemplo*, una solución o suspensión inyectable. Por ejemplo, puede empaquetarse en forma de unidad de dosificación.  
50

#### Breve descripción de las secuencias

55

**[0115]**

La SEQ ID NO:1 muestra la secuencia de la proteína TCTP humana.

Las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 a la SEQ ID NO:31 muestran secuencias ASO.

60 La SEQ ID NO:3 muestra la secuencia de un siRNA de TCTP según la invención.

La SEQ ID NO:4 muestra la secuencia de un oligonucleótido codificado que se ha utilizado como control.

La SEQ ID NO:5 muestra la secuencia de un ARNm de TCTP humano. Se indican las regiones a las que se dirigen los TCTP ASO de la SEQ ID NO:2 y los siRNA de TCTP de la SEQ ID NO:3.

La SEQ ID NO:32 muestra la secuencia de dA<sub>15</sub>.

65 La SEQ ID NO:33 muestra la secuencia de dT<sub>15</sub>.

[0116] La invención se describirá ahora más detalladamente mediante los ejemplos a continuación y los dibujos en el anexo.

## 5 Breve descripción de las figuras

[0117]

La **figura 1** muestra la fórmula estructural de LON con cadenas triples según la presente invención.

10

La **figura 2** muestra una representación esquemática de la liberación controlada de fármacos utilizando micelas basadas en LON monocatenario y bicatenario.

15

La **figura 3** muestra la solubilización acuosa de paclitaxel asistida por LON en tampón fosfato 1 mM y NaCl 100 mM.

20

La **figura 4** muestra la expresión de las proteínas TCTP y GAPDH, 3 días después de la transfección, en células prostáticas transfectadas, en ausencia de Oligofectamina con TCTP LASO#15 o con LASO codificado # Scr que sirve como control negativo.

25

La **figura 5** muestra histogramas que representan el nivel de los tamaños de las bandas de la transferencia Western de la figura 4.

30

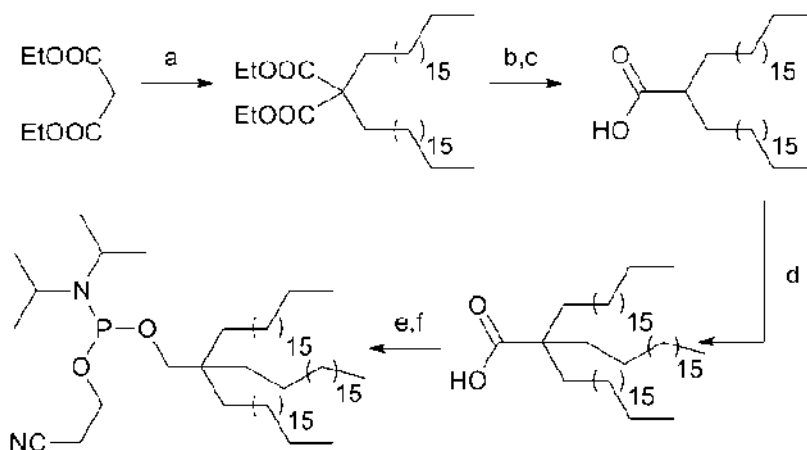
La **figura 6** muestra histogramas que representan el porcentaje medio de células prostáticas PC-3 viables, determinado por ensayo MTT, después de la transfección, en ausencia de Oligofectamina, con TCTP LASO#15 o con LASO codificado # Scr que sirve como control negativo.

## Ejemplos

### 30 Ejemplo 1

[0118] Este ejemplo describe la síntesis de la fosforamidita de cadena triple.

[0119] Las etapas necesarias para la síntesis del sintón de fosforamidita se indican esquemáticamente a 35 continuación.



### 1. Síntesis del ácido 2,2-bis-estearil acético 2

40

[0120] Se suspendió NaH (suspensión al 60 % en aceite) (1,517 g, 37,9 mmol) bajo argón en 20 ml de DMF seco. Se añadió gradualmente malonato de dietilo (1,93 ml, 12,6 mmol) a 0 °C. Después de 15 minutos, se añadió una solución de bromuro de estearilo (8,82 g, 26,5 mmol) en 20 ml de THF seco y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y 4 h a 50 °C. A continuación se añadió MeOH (10 ml) y ácido acético (2 ml) 45 seguido de 200 ml de agua fría. La fase acuosa se extrajo con 3x75 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas recogidas se lavaron con solución salina y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El sólido resultante se recrystalizó en iPrOH proporcionando 8,85 g de un sólido blanco.

[0121] El 2,2-bis-estearil dietil malonato **1** obtenido se añadió a una mezcla de KOH acuoso (5 g en 100 ml de agua) e iPrOH (100 ml). La mezcla se calentó a 80 °C durante 16 h y a continuación se diluyó con agua dando una

suspensión, que luego se neutralizó con 50 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso al 47 %. El sólido blanco resultante se filtró y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para proporcionar 5,5 g (77 % de rendimiento) de ácido bis-estearil malónico. Este ácido era casi insoluble en diclorometano o DMSO a temperatura ambiente y ligeramente más soluble en cloroformo. Su solubilidad en cloroformo aumenta considerablemente al calentar la solución por encima de 40 °C.

5

**[0122]** El ácido bis-estearil malónico se descarboxiló en decano hirviendo bajo atmósfera inerte, produciendo el ácido 2,2-bis-estearil acético **2** deseado, que se purificó por cromatografía (CHCl<sub>3</sub> como eluyente) para dar 5,5 g (77 % de rendimiento) del ácido 2,2-bis-estearilacético **2** deseado.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, 320 K, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,34 (m, 1H, CHCOOH), 1,63 (m, 3H), 1,50 (m, 3H), 1,48, 1,29 (m, 59H), 0,90 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, 320 K, CDCl<sub>3</sub>) δ 177,20, 45,89 (CH), 32,68, 32,11, 29,88, 29,84, 29,81, 29,76, 29,73, 29,68, 29,65, 29,54, 27,65, 22,83, 14,25 (CH<sub>3</sub>).

## 2. Síntesis del ácido 2,2,2-bis-estearil acético **3**

15 **[0123]** Se añadió lentamente LDA (solución 2 M, 6,56 ml, 13,12 mmol) a ácido 2,2-bis-estearilacético **2** (3,21 g, 5,68 mmol) en 85 ml de THF seco. La mezcla se calentó a continuación a 50 °C durante 2 h para disolver todos los materiales sólidos restantes. Se añadió en porciones bromuro de estearilo (7,29 g, 21,88 mmol) en 20 ml de THF seco al medio de reacción y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Los disolventes se evaporaron, se añadieron 15 ml de solución acuosa de HCl 1M. La fase acuosa se extrajo con hexano seguido de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas recogidas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El sólido bruto se recristalizó en hexano seguido de acetato de etilo para proporcionar 3,17 g (68 % de rendimiento) de **3** puro.

20 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,52 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-C-COOH), 1,25 (m, 97H), 0,88 (t, *J* = 6,4 Hz, 9H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 184,24, 48,82, 34,33 (ancho), 31,97, 30,18 (ancho), 29,76, 29,70, 29,53, 29,41, 23,85 (ancho), 22,73, 14,15 (CH<sub>3</sub>).

25

**[0124]** Este producto demostró ser especialmente reactivo al análisis de masas utilizando protocolos clásicos (ESI en modo positivo o negativo, MALDI con matrices ordinarias). Por el contrario, se obtuvo un espectro de masas muy limpio con una matriz DCTB (trans-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno]malononitrilo) dopado con Ag<sup>+</sup> (o Na<sup>+</sup>).

30

**[0125]** Procedimiento: Las muestras se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 10 mg/ml. La solución de matriz DCTB se preparó disolviendo 10 mg en 1 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. También se preparó una solución de agente de cationización (AgTFA, 10 mg/ml). Las soluciones se combinaron en una relación de volumen 10:1:1 de matriz a muestra a agente de cationización. Uno o dos microlitros de la solución obtenida se depositaron sobre la diana de la muestra y se secaron al vacío.

35

MS: C<sub>56</sub>H<sub>112</sub>O<sub>2</sub> (masa exacta = 816,87): detectada 923,80 [M+Ag]<sup>+</sup>, 1031,72 [M-H+2Ag]<sup>+</sup>.

## 3. Síntesis de 2,2,2-tris-estearil etanol

40 **[0126]** Se añadió lentamente LAH (0,45 g, 11,85 mmol) en porciones al ácido tris-estearil acético (2 g, 2,45 mmol) en THF seco (15 ml). La mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante 12 h. Se añadió agua seguida de HCl acuoso 1 M. La fase acuosa se extrajo con hexano. Las capas orgánicas recogidas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El bruto se recristalizó en hexano seguido de iPrOH para dar 1,40 g (71 % de rendimiento) de 2,2,2-tris-estearil etanol. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,35 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 1,25 (m, 94H), 1,16 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,5 Hz, 9H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 67,18, 39,47, 33,92, 31,95, 30,63, 29,73, 29,69, 29,39, 22,94, 22,72, 14,16 (CH<sub>3</sub>).

45

## 4. Síntesis de la fosforamidita **4**

**[0127]** El 2,2,2-tris-estearil etanol (330 mg, 0,41 mmol) se secó sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> durante la noche antes de su uso. A continuación se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (5 ml) que contenía diisopropiletilamina (0,115 ml, 0,66 mmol). El reactivo de fosforilación (0,12 ml, 0,53 mmol) se añadió a la mezcla de reacción. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y a continuación se inactivó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas recogidas se lavaron con agua y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El aceite resultante se cromatografió (Hex/EtOAc/TEA 40/2/1) para dar 0,38 g (92 % de rendimiento) de **4** puro como aceite incoloro.

55

RM: esta fosforamidita es bastante inestable en sílice y debe cromatografiarse rápidamente. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O CNE), 3,58 (m, 2H, iPr), 3,29 (sistema ABX, *J*<sub>AB</sub> = 9,9 Hz, *J*<sub>AX</sub> = 5,4 Hz, *J*<sub>BX</sub> = 5,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2,62 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 1,25 (m, 88H), 1,18-1,16 (m, 24H), 0,88 (t, *J* = 6,3 Hz, 9H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 117,77 (CN) 67,91 (d, *J* = 15,0 Hz), 58,22 (d, *J* = 18,0 Hz), 43,22 (d, *J* = 12,8 Hz), 39,56, 34,34, 32,09, 30,77, 29,88, 29,83, 29,53, 24,77 (d, *J* = 7,5 Hz), 23,04, 22,85, 20,52 (d, *J* = 6,0 Hz), 14,28. <sup>31</sup>P RMN (122 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150,56. MS (ESI, modo positivo) C<sub>65</sub>H<sub>131</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P (masa exacta = 1002,99): detectada 1003,1 [M]<sup>+</sup>

60

## Ejemplo 2

65 **[0128]** Este ejemplo describe la producción de PolyT 15mer de cadena triple (<sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub>) y polyA 15mer de

cadena triple (<sup>3</sup>LON-A15).

**[0129]** Antes de su uso, se secó la fosforamidita **4** sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> durante la noche. A continuación se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>CN 3/1 seco a una concentración de 0,1 M. Se usó N-benciliotetrazol para la activación de fosforamidita antes del acoplamiento. La fosforamidita **4** (solución 200 ml, 0,1 M) se acopló manualmente en último lugar sobre el soporte sólido con el activador y la fosforamidita (0,25 ml) durante 5 minutos. El desbloqueo y la separación del soporte sólido se logró mediante 1 ml de una solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>OH/etanol 3/1 (vol/vol) durante 5 h a 55 °C. Se recogió el sobrenadante y las perlas de CPG se lavaron 3 veces con 0,25 ml de EtOH/CH<sub>3</sub> H<sub>2</sub>O 3/1/1 (vol). Las soluciones se agruparon y evaporaron (speed vac).

10

**[0130]** A ese punto, los <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> y <sup>3</sup>LON-A<sub>15</sub> crudos se comportan de manera muy diferente. Mientras que el <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> crudo se pudo solubilizar fácilmente en 1 ml de agua milliQ, se obtuvo de <sup>3</sup>LON-A<sub>15</sub> un precipitado pesado. A continuación, se purificó el <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> en una columna de HPLC analítica C<sub>4</sub> de fase reversa con tampón A (acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,0, acetonitrilo al 5 %) y tampón B (acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,0, acetonitrilo al 80 %): aumento del gradiente desde 0 al 80 % de B en 10 min y a continuación se mantiene esta relación constante hasta 50 min. El LON se eluyó después de aprox. 42 min en estas condiciones. Las fracciones que contenían el LON se agruparon y se evaporaron a sequedad. El LON se disolvió en agua y se secó nuevamente dos veces para eliminar todas las trazas residuales de tampón. El rendimiento del <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> final fue excelente (40 %).

15

20 <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub>

**[0131]** Mezcla cruda (MS): aunque los inventores sabían que los análisis MALDI-TOF no son cuantitativos, la MS de la mezcla cruda parece indicar que el acoplamiento único de la fosforamidita **4** a la cadena polyT en el soporte sólido funcionó bien (los picos a 4504 (M+H)<sup>+</sup>, 4524 (M+Na)<sup>+</sup> y 4542 (M+K)<sup>+</sup> se corresponden con un dT<sub>15</sub> no modificado).

25

### **Ejemplo 3**

**[0132]** En este ejemplo, los LON fueron investigados por su capacidad para autoensamblarse y cargar paclitaxel. Para optimizar la inclusión del paclitaxel lipófilo, los LON se sintetizaron con 2 o 3 cadenas de hidrocarburos unidas en sus respectivos extremos 5' (figura 1). Los inventores demostraron que las micelas basadas en LON, que son hospedadores eficientes para fármacos hidrófobos como el paclitaxel, pueden proporcionar portadores de fármacos sensibles a los estímulos sensibles a la presencia de un oligonucleótido complementario.

30

### 35 **Materiales y procedimientos**

#### 1. Síntesis de la fosforamidita de cadena triple **4**

**[0133]** La fosforamidita **4** se sintetizó como se describe en el ejemplo 1. Cabe destacar que la MALDI-MS del ácido 2,2,2-tris-estearil acético muy lipófilo **3** requirió el uso de una matriz DCTB (trans-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno]malononitrilo) dopado con Ag<sup>+</sup> (o Na<sup>+</sup>).

40

**[0134]** Procedimiento: este análisis fue realizado por el CESAMO (Burdeos, Francia) en un espectrómetro de masas Voyager (*Applied Biosystems*). El instrumento está equipado con un láser de N<sub>2</sub> pulsado (337 nm) y una fuente de iones extraídos con retraso de tiempo. Los espectros se registraron en el modo de iones positivos utilizando el reflectrón y con un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 10 mg/ml. La solución de matriz DCTB se preparó disolviendo 10 mg en 1 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. También se preparó una solución de agente de cationización (AgTFA, 10 mg/ml). Las soluciones se combinaron en una relación de volumen 10:1:1 de matriz a muestra a agente de cationización. Uno o dos microlitros de la solución obtenida se depositaron sobre la diana de la muestra y se secaron al vacío.

45

50

#### 2. Síntesis de LON y MS

**[0135]** Los LON se sintetizaron utilizando la metodología de fosforamidita en un sintetizador de ADN Expedite 8909 automatizado en la escala μmol sobre soporte de cebador de 500 Å (carga: 60-100 μmol/g, Link technologies, vidrio de poro de control Synbase). La elongación del oligonucleótido se puede lograr siguiendo procedimientos de elongación de 3' a 5' y de 5' a 3'. En consecuencia, la fosforamidita modificada con nucleolípidos se inserta en la última posición (5' o 3', dependiendo del procedimiento de elongación seleccionado). Se usó agua milliQ esterilizada en autoclave cuando se requirió agua para el manejo de oligonucleótidos o LON.

55

60

**[0136]** Las mediciones de espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI-Tof-ToF (Ultraflex, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los mejores resultados se obtuvieron en el modo lineal con detección de iones positivos. Los espectros de masas se adquirieron con un voltaje de fuente de iones 1 de 25 kV, un voltaje de fuente de iones 2 de 23,5 kV, un voltaje de lente de 6 kV, al acumular las señales de iones de 1000 disparos láser con fluencia láser constante con un láser de 100 Hz. La calibración de masa externa se logró usando una mezcla de

65



oligonucleótidos dT<sub>12</sub>-dT<sub>18</sub> (Sigma).

**[0137]** Se detectó una mezcla 1: 1 de muestras de LON (□20-50 μM) y matriz en una diana MALDI y se secó al aire antes del análisis.

5

**[0138]** Se evaluó el rendimiento de las siguientes matrices: ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP), ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA) y 2,6-dihidroxiacetofenona (DHA). Se demostró que THAP a una concentración de 20 mg/ml en una mezcla 4:1 de etanol y citrato de amonio acuoso 100 mM produce resultados espectrales de masas óptimos.

10

### 3. Microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM)

**[0139]** Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se tomaron imágenes de las muestras mediante microscopía de tinción negativa con un microscopio electrónico Hitachi H 7650. Las muestras que contenían LON (las concentraciones y los tamaños medios se indican en las imágenes de TEM) se transfirieron a una rejilla de cobre recubierta de carbono durante diez minutos. La muestra se secó y se tiñó a continuación con 2,5 % (p/p) de acetato de uranilo en agua durante cinco minutos.

15

**[0140]** Microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se examinaron a un voltaje de aceleración de 10 kV. Típicamente, 20 ml de muestra que contenía los agregados LON se secaron sobre plaquetas de acero inoxidable pulido y a continuación se recubrieron con una capa de 6-10 nm de aleación de oro-paladio al vacío con un pulverizador Coater Balzers SCD050. Las observaciones se realizaron con un instrumento Philips XL30S FEG.

20

### 4. Solubilización de paclitaxel en soluciones acuosas de LON

25

**[0141]** Ejemplo representativo: solubilización de paclitaxel mediante una mezcla de oligonucleótidos dA<sub>15</sub> y <sup>3</sup>LON T<sub>15</sub>.

**[0142]** Preparación de las muestras. Para los experimentos de disolución asistida por LON de paclitaxel, se secaron 40 nmol de dA<sub>15</sub> y <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> (speedvac). A continuación se añadieron 0,2 ml de PBS (tampón fosfato 10 mM pH 7 + 100 mM de NaCl) y la mezcla se agitó con formación de vórtice.

30

**[0143]** La solución acuosa obtenida se añadió a un tubo de ensayo que contenía 0,6 mg de paclitaxel completamente seco. La agitación con formación de vórtice y a continuación el tratamiento con ultrasonidos a 30 °C durante 30 minutos produjo suspensiones turbias coloidales (las soluciones tampón puras dieron soluciones transparentes por encima del precipitado de paclitaxel). La posterior centrifugación (2000 rpm; 20 min) seguida de filtración a través de un filtro de 450 nm dio la muestra lista para el análisis por HPLC.

35

**[0144]** Determinación de las concentraciones de paclitaxel. Las concentraciones de paclitaxel en las diferentes soluciones acuosas se midieron por HPLC de fase inversa (Macherey Nagel EC 250/4 Nucleosil 120-5 C4) con detección a 227 nm. Condiciones de elución (eluyente A (V/V): 5 % de CH<sub>3</sub>CN/95 % de TEAA 0,1 M pH 7; eluyente B: 80 % de CH<sub>3</sub>CN/20 % de TEAA 0,1 M pH 7): isocrático (16 % de B) durante 2 min, 16->90 % de B después de 28 min y volver al 16 % de B.

40

**[0145]** Las concentraciones de paclitaxel se estimaron midiendo el área del pico de paclitaxel en el cromatograma después de la inyección de un volumen fijo (45 μL) de la solución. Este último se tradujo a una concentración de paclitaxel usando una curva de calibración. Las concentraciones probadas para la curva de calibración abarcaron el intervalo de concentraciones de paclitaxel obtenidas en los experimentos de carga de paclitaxel.

45

50

## Resultados y análisis

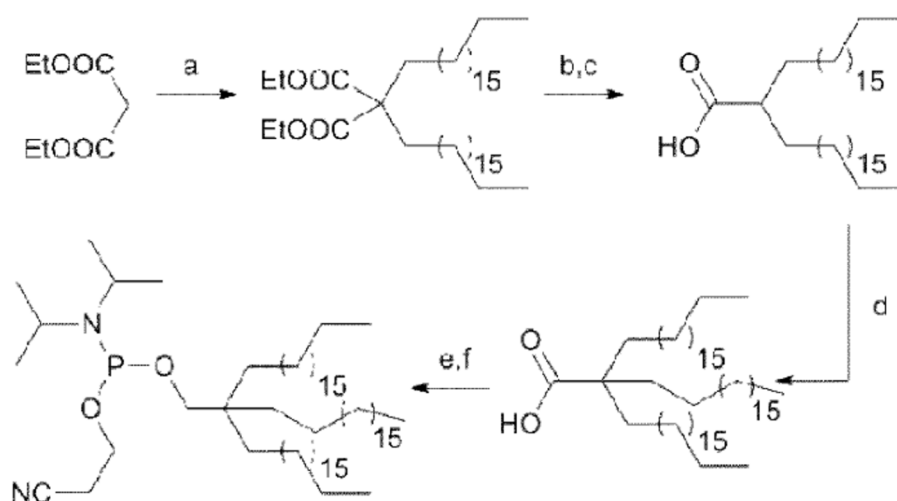
### 1. Química de los LON.

**[0146]** Los LON se sintetizaron eficientemente usando la química clásica de fosforamidita para oligonucleótidos.

55

**[0147]** La síntesis del modificador de la cadena triple de hidrocarburos se ilustra en el Esquema 1 a partir de malonato de dietilo y bromuro de estearilo.

60



[0148] La síntesis de éster malónico dio primero el aducto bis-estearílico **1**, que se hidrolizó y descarboxiló adicionalmente al monoácido **2**. Este último se alquiló a continuación con bromuro de estearilo después de la desprotonación con un exceso de LDA para dar el monoácido **3** de cadena triple. De relevancia y probablemente debido a su alta lipofilia, **3** se mostró bastante reactivo al análisis de masas tradicional (ESI y maldi con matrices orgánicas convencionales). El análisis de masas (maldi) de este compuesto requirió el uso de una matriz DCTB (trans-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo) dopado con Ag<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>. La reducción con LAH seguida de la fosforilación del alcohol resultante dio la fosforamidita **4** diana lista para la síntesis automatizada de oligonucleótidos con soporte sólido. Los oligonucleótidos dT<sub>15</sub> y dA<sub>15</sub> se derivatizaron con estas 2 fosforamiditas (figura 1). La eficacia de acoplamiento de la nueva fosforamidita **4** a la secuencia de oligonucleótido alargada no se pudo determinar directamente debido a la ausencia del grupo protector DMT en esta fosforamidita. Sin embargo, el rendimiento del acoplamiento fue bueno según lo estimado por la integración de las señales del espectro de masas de la mezcla de reacción cruda de <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> y el excelente rendimiento final del 40 % del LON purificado por HPLC. Las secuencias de oligonucleótidos dA<sub>15</sub> (adenina 15-mer) y dT<sub>15</sub> (timidina 15-mer) se agregaron a estos modificadores lipofílicos para investigar la influencia de la secuencia de oligonucleótidos. Esto dio como resultado la síntesis de cuatro LON diferentes (figura 1).

## 2. Propiedades fisicoquímicas de los LON.

[0149] Como tensioactivos verdaderos, los LON pueden autoensamblarse en medios acuosos. Se descubrió que tanto el segmento lipófilo como la secuencia de oligonucleótidos influyen notablemente en el comportamiento de agregación de los LON de la invención. En general y no sorprendentemente, los LON que contienen adenosina (<sup>3</sup>LON-A<sub>15</sub>) fueron menos solubles en agua que sus homólogos de timidina (<sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub>). Curiosamente, la presencia del motivo de cadena triple resultó en un comportamiento peculiar de <sup>3</sup>LON-A<sub>15</sub> y <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub>. Este último podría ser purificado por HPLC y caracterizado por MS. Sin embargo, se observó una tendencia de agregación lenta después del almacenamiento a -20 °C, siendo <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> aún detectable por MS en la solución. En contraste, la agregación inmediata e irreversible de <sup>3</sup>LON-A<sub>15</sub> tuvo lugar después de la escisión y desprotección del LON crudo. Los agregados fueron tan estables que la detección por MS y la purificación de <sup>3</sup>LON-A<sub>15</sub> por PAGE o HPLC resultó imposible. En consecuencia, la dispersión dinámica de la luz, la microscopía electrónica de transmisión y los experimentos SEM se llevaron a cabo con las soluciones de solo un LON purificado. Las muestras acuosas que contenían LON se estudiaron en diferentes condiciones, incluyendo agua pura y suspensiones acuosas de diferente fuerza iónica y temperatura (25-45 °C). Todos los LON investigados, en concreto, <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> produjeron pequeños objetos esféricos que variaban de aproximadamente 8 a 20 nm de diámetro, caracterizados por DLS, microscopías electrónicas de transmisión y barrido (TEM y SEM). Por ejemplo, las imágenes de TEM y SEM de muestras de <sup>3</sup>LON-A<sub>15</sub> disueltas en agua pura muestran agregados micelares. La arquitectura micelar de estos ensamblados puede explicarse basándose en las dimensiones moleculares de LON de 15 nucleobases de longitud. De hecho, dichas moléculas son flexibles, con una estructura en forma de cono y dimensiones compatibles con la autoagregación en micelas esféricas. El estudio DLS de <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub> en agua indica que el tamaño de los agregados es poco sensible a la fuerza iónica. Del mismo modo, el tamaño de los agregados se ve poco afectado por la temperatura en el intervalo de 25-45 °C o la concentración del anfífilo.

## 3. Experimentos de carga de fármacos.

[0150] Los experimentos fisicoquímicos y las observaciones de microscopía demostraron que los LON se autoasocian en agregados similares a micelas. Los inventores plantearon la hipótesis de que el núcleo hidrófobo de los agregados LON podría promover la solubilización en ambientes acuosos de fármacos hidrófobos como el paclitaxel. Con este fin, los LON se solubilizaron (soluciones 200 o 300 μM) en tampón PBS 10 mM a pH 7 y NaCl 100 mM. Las soluciones acuosas de LON se sometieron a un baño de ultrasonidos y se calentaron en presencia de una película

delgada de paclitaxel y las suspensiones resultantes se filtraron a través de un poro de 0,4 µm para eliminar los agregados de paclitaxel no incorporados. Las concentraciones de paclitaxel que aún permanecían en solución se determinaron a continuación mediante RP-C<sub>4</sub>-HPLC (figura 3). Para una secuencia de oligonucleótidos dada, esto parece indicar que la solubilidad del paclitaxel es proporcional al número de átomos de carbono presentes en las cadenas de hidrocarburos de los LON. Por otro lado, se encontró inesperadamente que la secuencia de oligonucleótidos era de importancia primordial.

#### 4. Análisis.

10 **[0151]** Lo que impulsa la liberación del fármaco cargado en el núcleo hidrófobo de los agregados en la hibridación de ADN no es evidente a primera vista. Primero debe observarse que la naturaleza de los agregados LON no cambia al unirse el ADN y los agregados micelares todavía se observan en presencia del ADN. Sin embargo, se observó una contracción de la micela central después de la hibridación del dA<sub>15</sub> complementario con agregados de <sup>3</sup>LON-T<sub>15</sub>. Dicha contracción del núcleo micelar no se observa con el ncDNA. Estos resultados son bastante inesperados. De hecho, se espera que la formación del dsDNA en forma de bastoncillo, bastante largo y rígido, aumentara el tamaño de la micela en comparación con el segmento de ssDNA bastante flexible de los LON. En consecuencia, los presentes resultados de DLS sugieren fuertemente que el núcleo hidrófobo micelar experimenta mucha contracción tras la formación de dúplex de ADN. Esta observación puede arrojar luz sobre el mecanismo de la liberación desencadenada de paclitaxel de las micelas LON. De hecho, las cabezas polares ss-DNA de LON pueden experimentar libertad conformacional en la fase acuosa dentro de los agregados LON. El área de superficie ocupada por cada cabeza polar de ss-LON puede ser bastante grande. En consecuencia, las cadenas de alquilo LON pueden estar mal empaquetadas dentro del núcleo hidrófobo, dejando espacio para alojar hospedadores hidrófobos. Por el contrario, la rigidez y la sección transversal bastante pequeña de las dobles hélices de ADN podrían permitir una mejor compactación de las cadenas de alquilo dentro del núcleo de la micela con la liberación conjunta de parte de las moléculas de paclitaxel cargadas.

#### Conclusiones

30 **[0152]** En este estudio, los inventores presentan la síntesis de LON con cadenas lipófilas triples. Estos LON se autoensamblan en micelas, que son propensas a alojar moléculas de paclitaxel dentro de sus núcleos hidrófobos. Estos resultados demuestran que la composición de los LON tanto en términos de la secuencia de lípidos como de oligonucleótidos afecta su capacidad para alojar moléculas lipófilas. En general, la secuencia de polinucleótidos cumple tres funciones: (1) promueve la transferencia de las cadenas de alquilo de los LON al agua, (2) potencializa el consumo de fármacos de los agregados de LON y (3) puede hibridarse con la secuencia de ADN para desencadenar la liberación del fármaco.

40 **[0153]** Se han desarrollado numerosos sistemas de suministro de fármacos de estímulo-bio-respuesta para inducir la liberación del fármaco en respuesta a determinados estímulos como el pH, la temperatura, el potencial redox, las enzimas, la luz y la ecografía. En esta contribución, los inventores demuestran que la carga de fármacos de nanomateriales basados en LON puede modularse mediante un estímulo de oligonucleótido complementario. Los agregados LON proporcionan una alternativa original y específica de estímulo-bio-respuesta para abordar el problema del suministro controlado de fármacos.

#### Ejemplo 4

45 **[0154]** <sup>3</sup>LASO#15: ADN de secuencia SEQ ID NO: 6 con un esqueleto de fosfodiéster que lleva una cadena alquílica triple en su extremo 5' (C18)<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>-O-P(=O)(-O[-1])-O-5'-AAC TTG TTT CCT GCA GGT GA-3'-OH.

50 **[0155]** Este ejemplo describe la producción de un oligonucleótido antisentido conjugado a lípidos (LASO) que presenta la secuencia ASO#15 y una cadena triple insertada en el extremo 5'.

55 **[0156]** Antes de su uso, se secó la fosforamidita 4 sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> durante la noche. A continuación se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>CN 3/1 seco a una concentración de 0,1 M. Se usó N-benciltiotetrazol para la activación de fosforamidita antes del acoplamiento. La fosforamidita 4 (solución 200 ml, 0,1 M) se acopló manualmente en último lugar sobre el soporte sólido con el activador y la fosforamidita (0,25 ml) durante 5 minutos. El desbloqueo y la separación del soporte sólido se logró mediante 1 ml de una solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>OH/etanol 3/1 (vol/vol) durante 5 h a 55 °C. Se recogió el sobrenadante y las perlas de CPG se lavaron 3 veces con 0,25 ml de EtOH/CH<sub>3</sub> H<sub>2</sub>O 3/1/1 (vol). Las soluciones se agruparon y evaporaron (speed vac).

60 A ese punto, se purificó el <sup>3</sup>LASO#15 crudo en una columna de HPLC analítica C<sub>4</sub> de fase reversa con tampón A (acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,0, acetonitrilo al 5 %) y tampón B (acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,0, acetonitrilo al 80 %): aumento del gradiente desde 0 al 80 % de B en 10 min y a continuación se mantiene esta relación constante hasta 50 min.

Análisis de masas MALDI-TOP: <sup>3</sup>LASO#15: [M+H]<sup>+</sup> detectado: 6985 Da.

#### 65 Ejemplo 5

**[0157]** Este ejemplo muestra que los oligonucleótidos modificados según la invención son capaces de inhibir la expresión de TCTP.

**5 Materiales y procedimientos**

*Oligonucleótidos*

**[0158]** Se utilizaron diferentes oligonucleótidos modificados:

10

- LASO#15: ADN de la secuencia SEQ ID NO:6 con una cadena principal de fosfodiéster que lleva una cadena de alquilo triple en su extremo 5';

- LASO#Scr: ADN de la secuencia SEQ ID NO:4 con una cadena principal de fosfodiéster que lleva una cadena de alquilo triple en su extremo 5';

15

*Líneas celulares y condiciones de cultivo celular*

**[0159]** La línea celular de cáncer de próstata CR PC-3 se adquirió de la *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EE. UU.). Las células se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia), suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS).

20

*Transfecciones*

**[0160]** El oligonucleótido conjugado a lípidos, LASO#15 se probó en la expresión de la proteína TCTP usando transferencia Western (se usó LA- SO#Scr como control negativo).

25

**[0161]** La línea celular prostática se transfectó con LASO#15 a diversas concentraciones (de 30 nM a 100 nM), en medio Opti-MEM® (Invitrogen), sin suero y en ausencia del reactivo de transfección Oligofectamine™ (Invitrogen).

30

**[0162]** Se añadió suero 4 horas después de la transfección. Dos o tres días después de la transfección, se determinó el nivel de expresión de las proteínas TCTP y GAPDH (que se usa como gen de mantenimiento) mediante transferencia Western, y se evaluaron los efectos inhibidores del crecimiento *in vitro* de LASO#15 en células PC-3 mediante un ensayo MTT.

35 *Análisis por transferencia Western*

**[0163]** El análisis de transferencia Western se realizó como se describe anteriormente (Rocchi y col., 2004, Cancer Res. 64: 6595-602) con anticuerpo policlonal TCTP de conejo 1:2000 (Abcam Inc., Cambridge, Reino Unido). Los niveles de carga se normalizaron usando policlonal anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de conejo 1:5000

40

(Abcam Inc.).

*Ensayo MTT*

**[0164]** El ensayo MTT se realizó como se describe anteriormente (Rocchi y col., 2004, Cancer Res. 64:6595-602).

45

**Resultados**

**[0165]** Como se muestra en las figuras 4 y 5, los inventores demostraron que la adición de una cadena alquílica triple en la parte 5' del oligonucleótido antisentido permite inhibir específicamente la proteína TCTP, incluso en ausencia del agente de transfección Oligofectamine™, en particular cuando el oligonucleótido antisentido se usó a una concentración de 100 nM.

50

**[0166]** Los inventores también observaron que la inhibición específica de la proteína TCTP con LASO#15 permitió inhibir el crecimiento de las células PC-3 (véase la figura 6).

55

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0167]**

60

<110> INSERM UNIVERSITE DE BORDEAUX  
Universite d'Aix-Marseille  
Institut Jean Paoli & Irene Calmettes

65

<120> Oligonucleótidos antisentido modificados hidrofólicamente que comprenden una cadena alquílica triple

ES 2 755 126 T3

<130> BET13P1372

<150> PCT/IB2013/001516

5 <151> 05/06/2013

<160> 33

<170> Versión de PatentIn 3.5

10

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp  
1 5 10 15

Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu  
20 25 30

Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile  
35 40 45

Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser  
50 55 60

Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu  
65 70 75 80

Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met  
85 90 95

Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys  
100 105 110

Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn  
115 120 125

Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly  
130 135 140

Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met

145 150 155 160

Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys  
165 170

ES 2 755 126 T3

<210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP  
 <400> 2  
 10 accaatgagc gagtcatcaa 20  
 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> siRNA dirigido a TCTP  
 20 <400> 3  
 aaccgucgc ggaucuccg g 21  
 <210> 4  
 <211> 19  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido codificado  
 30 <400> 4  
 cgtgtaggta cggcagatc 19  
 <210> 5  
 <211> 829  
 35 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (153)..(173)  
 <223> Región diana del siRNA de la SEQ ID NO:3  
 <220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (221)..(240)  
 <223> Región diana del oligonucleótido antisentido de la SEQ ID NO:2  
 <400> 5  
 50  
 cccccgagc gccgctcagg ctgcaccgcg ctgcgtccga gtttcaggct cgtgctaagc 60  
 tagcgccgtc gtcgtctccc ttcagtcgcc atcatgatta tctaccggga cctcatcagc 120

ES 2 755 126 T3

cacgatgaga tgttctccga catctacaag atccgggaga tcgcgggacgg gttgtgcctg 180  
gaggtggagg ggaagatggt cagtaggaca gaaggtaaca ttgatgactc gctcattggt 240  
ggaaatgcct ccgctgaagg ccccgagggc gaaggtaccg aaagcacagt aatcactggt 300  
gtcgatattg tcatgaacca tcacctgcag gaaacaagtt tcacaaaaga agcctacaag 360  
aagtacatca aagattacat gaaatcaatc aaagggaaac ttgaagaaca gagaccagaa 420  
agagtaaaac cttttatgac aggggctgca gaacaaatca agcacatcct tgctaatttc 480  
aaaaactacc agttctttat tggtgaaaac atgaatccag atggcatggt tgctctattg 540  
gactaccgtg aggatggtgt gaccccatat atgattttct ttaaggatgg tttagaaatg 600  
gaaaaatggt aacaaatgtg gcaattatct tggatctatc acctgtcatc ataactggct 660  
tctgcttgtc atccacacaa caccaggact taagacaaat gggactgatg tcatcttgag 720  
ctcttcattt attttgactg tgatttattt ggagtggagg cattgttttt aagaaaaaca 780  
tgatcatgtag gttgtctaaa aataaaatgc atttaactc atttgagag 829

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región diana del oligonucleótido antisentido de la SEQ ID NO:2

10 <400> 6

aactgtttc ctgcaggta 20

<210> 7

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP

20

<400> 7

tggttcatga caatatcgac 20

<210> 8

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP

30

<400> 8

taatcatgat ggcgactgaa 20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP

40

## ES 2 755 126 T3

	<400> 9		
	gctgatgagg tcccggtaga	20	
5	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP		
	<400> 10		
	tcggagaaca tctcatcgtg	20	
15	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP		
	<400> 11		
25	caggcacaac ccgtccgcga	20	
	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP		
	<400> 12		
35	accatcttcc cctccacctc	20	
	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP		
45	<400> 13		
	tgttacctc tgcctactg	20	
	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP		
55	<400> 14		
	ccttcagcgg aggcatttcc	20	
60	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
65	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP		



## ES 2 755 126 T3

	<400> 15 cagtaccttc gccctcgggg	20
5	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP	
15	<400> 16 accagtgatt actgtgctt	20
20	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP	
30	<400> 17 ctgtaggct tcttttga	20
35	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP	
45	<400> 18 atgtaatctt tgatgtact	20
50	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP	
60	<400> 19 gttcccttt gattgattc	20
65	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP	
75	<400> 20 ttctgtctc tgttctcaa	20
80	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<220>	

# ES 2 755 126 T3

<223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP  
 <400> 21  
 5 ataaagaact ggtagtttt 20  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP  
 <400> 22  
 15 ctggattcat gtttcacca 20  
 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP  
 25 <400> 23  
 caatagagca accatgccat 20  
 <210> 24  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP  
 35 <400> 24  
 acaccatcct cacgtagtc 20  
 <210> 25  
 40 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP  
 <400> 25  
 agaaaatcat atatggggtc 20  
 <210> 26  
 50 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP  
 <400> 26  
 60 catttctaaa ccatccttaa 20  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 755 126 T3

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP

5 <400> 27  
 ttaacatttc tccatttcta 20

<210> 28  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP

15 <400> 28  
 tctcccggat cttgtagatg 20

<210> 29  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP

25 <400> 29  
 gtcataaaaag gttttactct 20

<210> 30  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP

35 <400> 30  
 tgatttggtc tgcagcccct 20

40 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido dirigido a TCTP

50 <400> 31  
 gaaattagca aggatgtgct 20

<210> 32  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> dA15

60 <400> 32  
 aaaaaaaaaa aaaaa 15

<210> 33  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

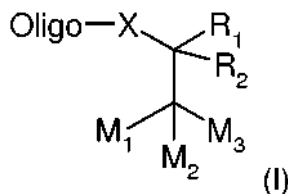
<220>  
<223> dT15

5 <400> 33  
tttttttt tttt

15

## REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido modificado de fórmula general (I):



5

en el que:

- Oligo representa una secuencia de oligonucleótidos antisentido que puede estar orientada 3'-5' o 5'-3', de ADN, ARN, 10 monocatenario y/o comprende nucleótidos modificados;
- X representa un resto enlazador divalente seleccionado de entre éter -O-, tio -S-, amino -NH- y metileno -CH<sub>2</sub>-;
- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser idénticos o diferentes y representan:

- (i) un átomo de hidrógeno,
- 15 (ii) un halógeno, en particular un átomo de flúor,
- (iii) un grupo hidroxilo,
- (iv) un grupo alquilo que comprende de 1 a 12 átomos de carbono;

- M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> pueden ser idénticos o diferentes y representan:

20

- una cadena de hidrocarburos saturados o insaturados, lineales o ramificados, que comprende de 12 a 30 átomos de carbono, que puede estar sustituido en el átomo de carbono terminal por un grupo éster alifático o aromático, en particular bencílico o naftílico;

- un radical acilo con 12 a 30 átomos de carbono, o

25 - un grupo acilglicerol, esfingosina o ceramida,

para su uso como un medicamento.

2. El oligonucleótido modificado para su uso según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido es un oligonucleótido 30 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6.

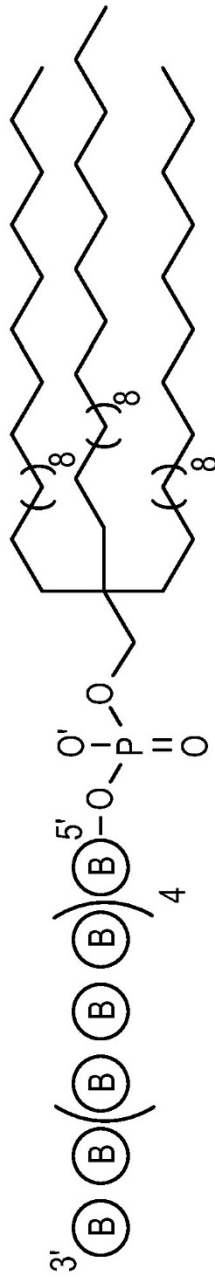
3. El oligonucleótido modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el resto enlazador divalente es éter -O-.

35 4. El oligonucleótido modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son átomos de hidrógeno.

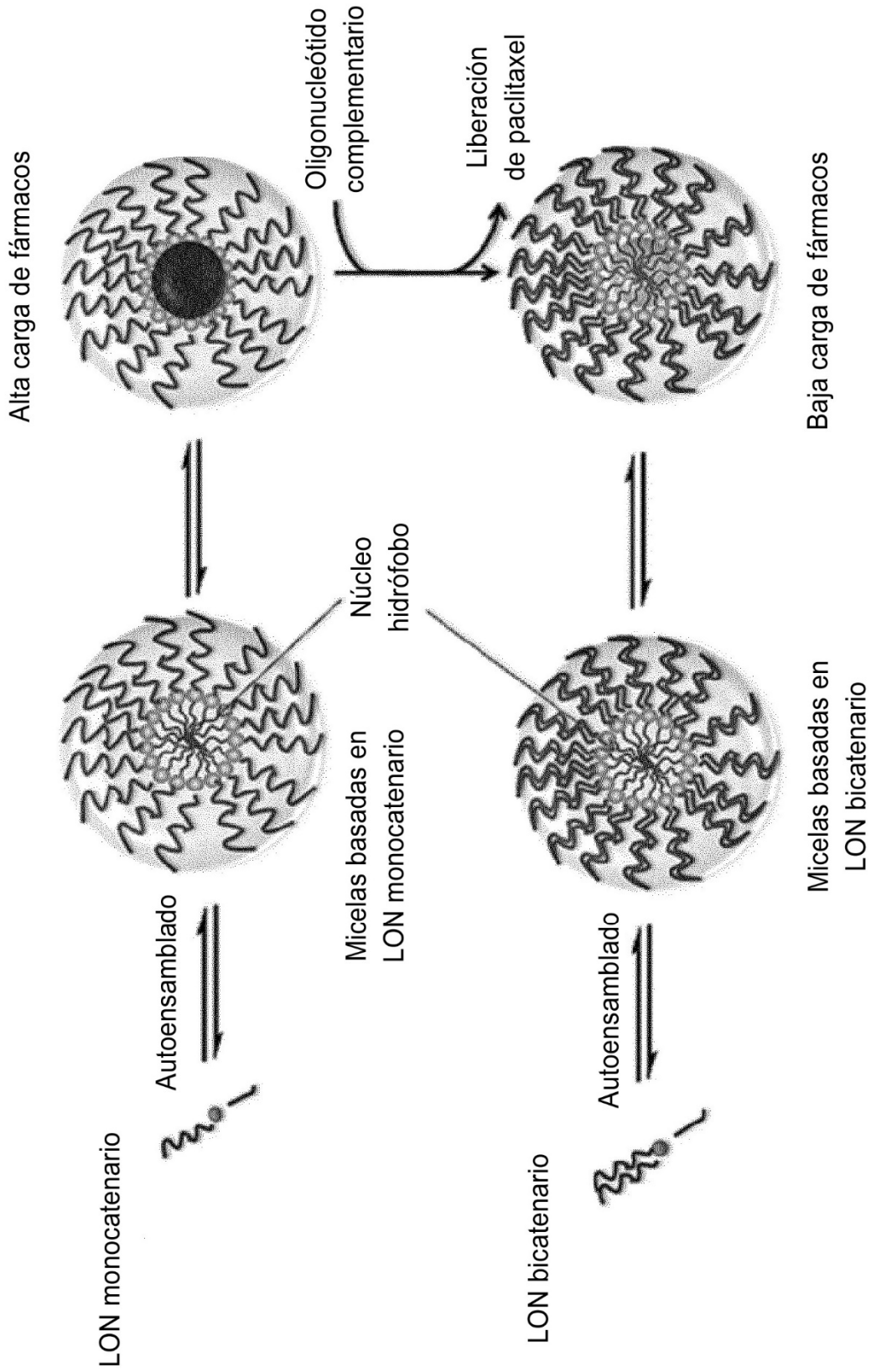
5. El oligonucleótido modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> 40 representan una cadena de hidrocarburos que comprende de 12 a 20 átomos de carbono.

6. El oligonucleótido modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, en el que el oligonucleótido comprende un fragmento de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 (5'-ACCAATGAGCGAGTCATCAA-3'), la SEQ ID NO: 3 (5'-AACCCGUCGCGAUCUCCCGG-3'), la SEQ ID NO: 6 (5'-AACTTGTTTCCTGCAGGTGA-3'), la SEQ ID NO: 7 (5'-TGGTTCATGACAATATCGAC-3'), la SEQ ID NO: 8 (5'-TAATCATGATGGCGACTGAA-3'), la SEQ ID NO: 16 (5'-ACCAGTGATTACTGTGCTTT-3'), la SEQ ID NO: 17 (5'-CTTGTAGGCTTCTTTTGTGA-3'), la SEQ ID NO: 18 (5'-ATGTAATCTTTGATGTACTT-3'), la SEQ ID NO: 19 (5'-GTTTCCCTTTGATTGATTTTC-3'), la SEQ ID NO: 20 (5'-TTCTGGTCTCTGTTCTTCAA-3'), la SEQ ID NO: 25 (5'-AGAAAATCATATATGGGGTC-3'), la SEQ ID NO: 27 (5'-TTAACATTTCTCCATTTCTA-3'), la SEQ ID NO: 29 (5'-GTCATAAAAAGGTTTTACTCT-3') y la SEQ ID NO: 31 (5'-GAAATTAGCAAGGATGTGCT-3').

7. El oligonucleótido antisentido modificado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el tratamiento del cáncer.



**FIG.1**



**FIG.2**

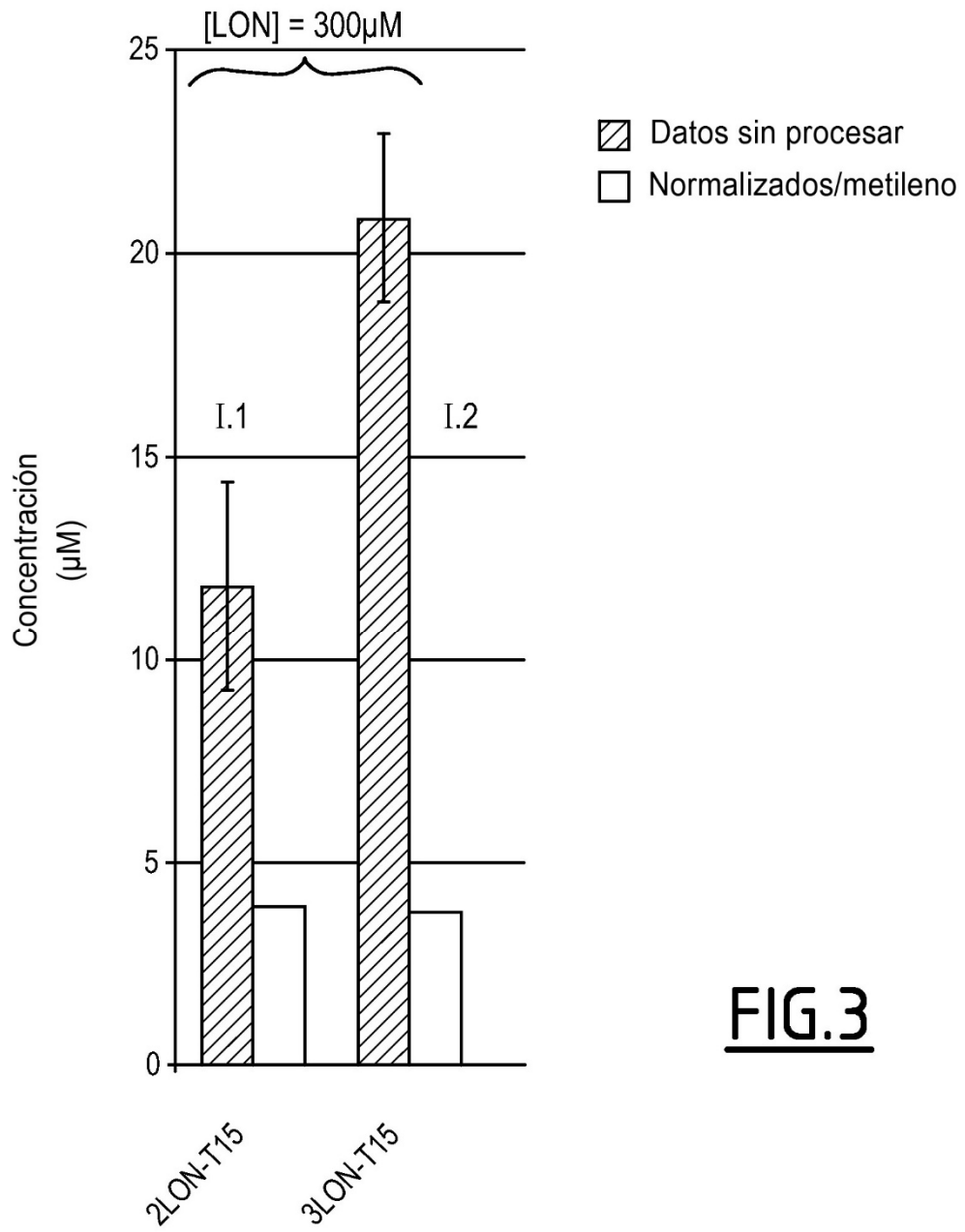


FIG.3



### LASO#15

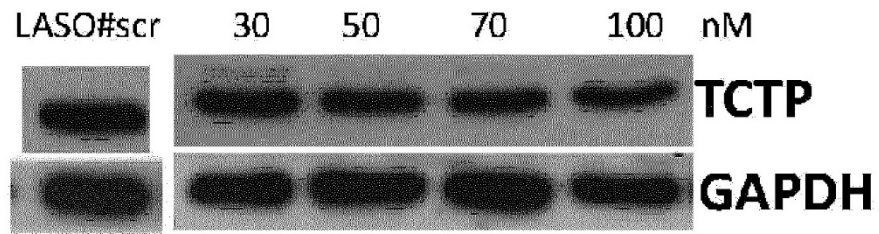


FIG.4

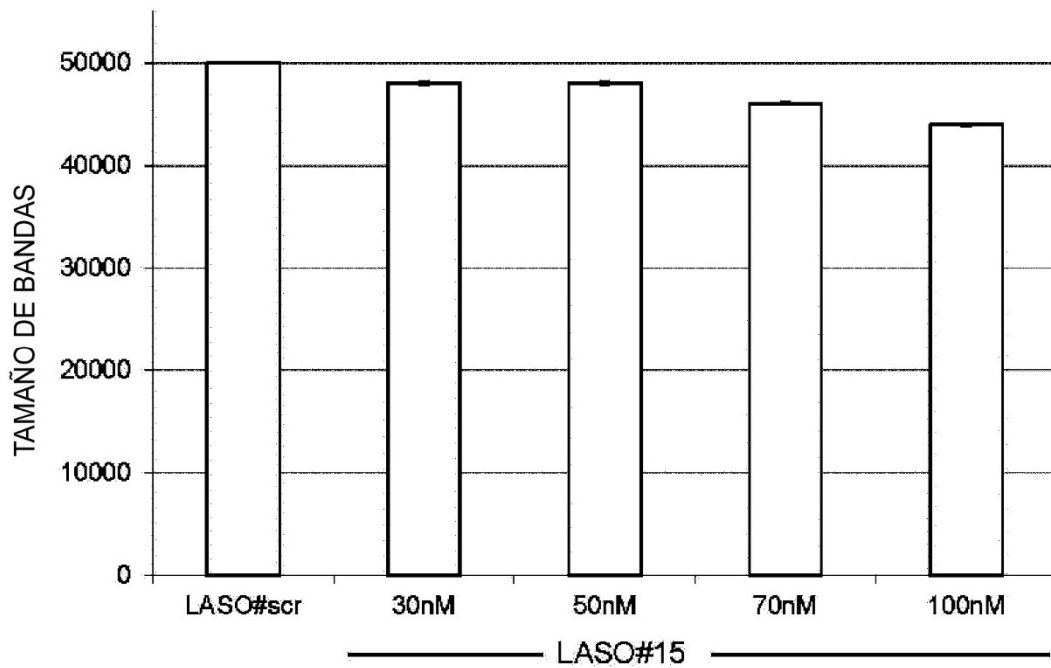


FIG.5

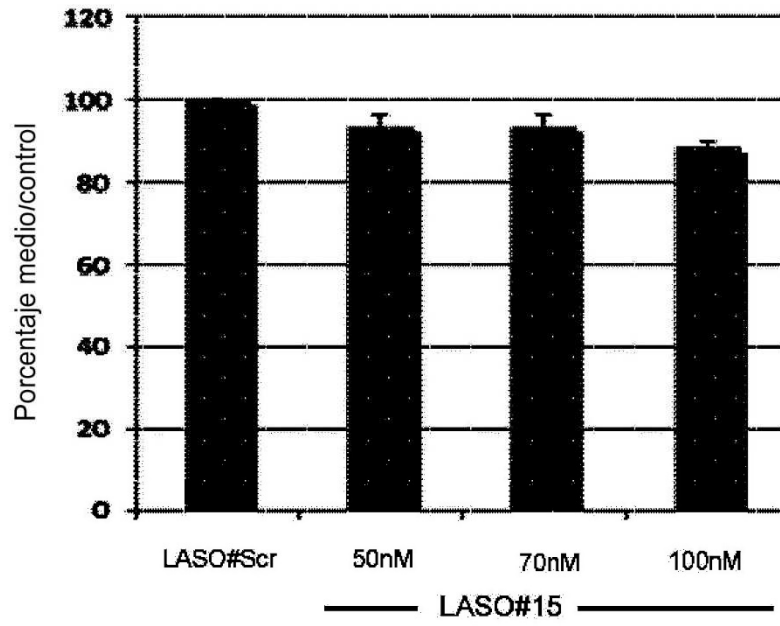


FIG.6