

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 459**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2016 PCT/EP2016/068162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017 WO17017253**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2016 E 16750690 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3329004**

54 Título: **Oligonucleótidos terapéuticos**

30 Prioridad:

29.07.2015 WO PCT/EP2015/178809

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

02.09.2020

73 Titular/es:

**IFOM FONDAZIONE ISTITUTO FIRCI DI
ONCOLOGIA MOLECOLARE (100.0%)
Via Adamello 16
20139 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**D'ADDA DI FAGAGNA, FABRIZIO;
ROSSIELLO, FRANCESCA;
AGUADO, JULIO y
JONES-WEINERT, COREY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 781 459 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 terapéuticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un oligonucleótido que comprende una de las siguientes secuencias: (TTAGGG) SEQ ID N° 1, (TAGGGT) SEQ ID N° 2, (AGGGTT) SEQ ID No. 3, (GGGTTA) SEQ ID No. 4, (GGTTAG) SEQ ID No. 5 o (GTTAGG) SEQ ID No. 6 o una secuencia complementaria del mismo o un fragmento o una variante o una mezcla de los mismos para usar en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad caracterizada por un alargamiento alternativo de los telómeros o una afección no cancerosa asociada con la disfunción de los telómeros y las composiciones farmacéuticas relativas y con la composición farmacéutica y el método relativos.

10 Antecedentes

El ADN es un tipo único de molécula en una célula que, si está dañado, no puede ser reemplazado. La llamada "respuesta al daño del ADN" (DDR) es un conjunto coordinado de eventos conservados evolutivamente que, cuando se activa al detectar el daño del ADN, detiene el ciclo celular (función del punto de control del daño del ADN) y coordina la reparación del ADN (Jackson y Bartek, 2009). El daño al ADN es un evento fisiológico. El envejecimiento y el cáncer son probablemente los dos mejores ejemplos en mamíferos que destacan la relevancia de la acumulación de daños en el ADN, la activación de DDR y sus consecuencias. Se ha hecho una contribución significativa a la comprensión del compromiso de DDR tanto en el envejecimiento como en el cáncer (d'Adda di Fagagna, 2008; Jackson y Bartek, 2009).

15 Más recientemente, los presentes inventores han presentado e informado que la activación completa de DDR depende de las moléculas de ARN. Observaron que las roturas de la doble cadena del ADN (DSB) desencadenan la generación local de ARN no codificantes en el sitio del daño del ADN que transporta la secuencia que rodea el sitio dañado. También han demostrado que estos ARN (los autores los llamaron DDRNA) son esenciales para la activación del DDR. De hecho, la eliminación del DDRNA por el tratamiento con RNasa A inhibe la activación de DDR, y DDR puede restaurarse completamente mediante la adición de DDRNA sintetizado químicamente que lleva la secuencia que rodea el sitio dañado pero no otras secuencias (Francia et al., 2012).

20 Varios estudios han demostrado que las funciones del ARN pueden inhibirse mediante el uso de oligonucleótidos antisentido inhibidores (ASO) que actúan emparejándose con ARN diana y perjudicando así sus funciones. Su uso está alcanzando con éxito la etapa clínica (Janssen et al., 2013; Li y Rana, 2014; Monteleone et al., 2015; Stenvang et al., 2012). Las células cancerosas deben preservar la longitud de los telómeros y contrarrestar el desgaste natural de los telómeros para retener el potencial proliferativo ilimitado. La mayoría de las células cancerosas logran esto reactivando la expresión de las telomerasas, una enzima que alarga los telómeros cortos. Sin embargo, el 10-15% de todos los tumores humanos, con una mayor incidencia, aunque no exclusivamente, en osteosarcomas, sarcomas de tejidos blandos, tumores cerebrales primarios, glioblastomas multiformes (GBM) y neuroblastomas mantienen la longitud de los telómeros mediante el llamado mecanismo de alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) basado en la recombinación homóloga (HR) entre los telómeros (Cesare y Reddel, 2010; Durant, 2012; Henson y Reddel, 2010).

Aunque los tumores ALT pueden portar diferentes mutaciones genéticas consecuencia de su estado transformado y maligno, la mayoría de las células cancerosas ALT muestran mutaciones en los genes DAXX y ATRX, lo que hace posible la clasificación de tumores como ALT mediante análisis genéticos comunes (Heaphy et al., 2011).

40 Nunca se había sabido anteriormente de mecanismos ALT en células sanas/normales (Cesare y Reddel, 2010). Sin embargo, además del cáncer, se han mostrado mecanismos ALT en células infectadas con EBV (Kamranvar et al., 2013) destacando la posibilidad de que otras infecciones virales puedan desencadenar dichos mecanismos.

45 El uso de inhibidores de la telomerasa en la terapia del cáncer se ha investigado ampliamente (Ruden y Puri, 2013); sin embargo, una limitación intrínseca de este enfoque es que la falta de actividad de la telomerasa en los tumores puede conducir a la selección de clones ALT positivos, como se mostró en (Hu et al., 2012). De manera diferente, hasta el momento, no se han publicado reversiones de mecanismos de ALT a telomerasa con respecto al mantenimiento de telómeros.

50 Las células ALT muestran una activación crónica de DDR en los telómeros, lo que indica la naturaleza disfuncional de los telómeros en dichas células. Los telómeros críticamente cortos/disfuncionales son posteriormente alargados/"reparados" por el mecanismo DDR que activa las vías de FC. Los cuerpos de PML asociados con ALT (APB) contienen ADN telomérico y factores DDR y son un biomarcador conocido de células ALT (Cesare y Reddel, 2010; Yeager et al., 1999). HR es un mecanismo de reparación de ADN parte de DDR y se ha demostrado que es necesario para el mantenimiento de los telómeros en las células ALT.

55 El complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1) es un factor DDR clave involucrado en la vía de la FC. De hecho, su inactivación por la sobreexpresión de la proteína inhibidora SP100 o la caída mediada por una horquilla corta, determina la inhibición del mantenimiento de los telómeros específicamente en las células ALT positivas (Jiang et al.,

2005; Jiang et al., 2007; Zhong et al., 2007). El agotamiento mediado por la interferencia de ARN del complejo SMC5/6, que promueve la reparación mediada por HR de los DSB, produce telómeros acortados y senescencia celular en las células ALT (Potts y Yu, 2007). La RPA se une al ADN de cadena sencilla durante la fase inicial de la FC y su regulación a la baja a través de la interferencia de ARN causa un deterioro en la actividad ALT (Jiang et al., 5 2007). Más recientemente, se ha demostrado que un inhibidor de molécula pequeña ATR previene el crecimiento celular específicamente de células ALT positivas (Flynn et al., 2015), aunque esta especificidad parece ser más amplia, incluidas las células cancerosas no ALT y solo en combinación con CHK1 inhibidores (Sanjiv et al., 2016). Consistentemente, otro informe reciente sugirió que la especificidad del tipo celular de los inhibidores de ATR está más relacionada con la confluencia celular que con el mecanismo de mantenimiento de los telómeros 10 (<http://biorxiv.org/content/early/2016/06/04/053280>)

La inhibición de DDR y los consiguientes eventos de recombinación en los telómeros en las células ALT podrían explotarse para concebir nuevas vías terapéuticas potenciales para los tratamientos anticancerígenos. Consistentemente, como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que las células ALT son altamente sensibles a la inhibición de la quinasa ATR (Flynn et al., 2015), una proteína involucrada en la señalización DDR en el contexto 15 de la reparación del ADN por HR, aunque su especificidad ha sido recientemente cuestionada (Sanjiv et al., 2016) y (<http://biorxiv.org/content/early/2016/06/04/053280>).

De manera similar, se espera que las condiciones caracterizadas por el daño del ADN telomérico que a menudo conducen a un fenotipo progérico (envejecimiento prematuro) estén asociadas con la generación de DDRNA con una secuencia telomérica.

20 El documento WO2013/167744 se refiere a pequeñas moléculas de ARN (DDRNA) producidas en un sitio de daño en el ADN y que tienen la secuencia específica del locus dañado. La existencia y la generación de DDRNA a partir de telómeros en células que exhiben ALT, como las células de cáncer ALT, o en células ALT infectadas con EBV o en células de condiciones de envejecimiento prematuro no se describe ni sugiere la inhibición de DDRNA como razón terapéutica.

25 El documento WO2014092609 se refiere a un método para influir en el estado proliferativo de las células usando secuencias de oligonucleótidos de cadena G específicas de ADN telomérico humano.

El documento US2013065950 describe compuestos que comprenden un resto oligonucleotídico unido covalentemente a un resto lipídico. El resto oligonucleotídico comprende una secuencia que es complementaria al componente de ARN de la telomerasa humana. Los compuestos inhiben la actividad de la telomerasa en las células.

30 El documento WO97/38013 no se refiere específicamente a una enfermedad (en particular un cáncer) caracterizada por un alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) ni a una afección no cancerosa caracterizada por telómeros disfuncionales. Además, se relaciona con la inhibición de la telomerasa. Por el contrario, los oligonucleótidos de la presente invención no son activos en las células cancerosas telomerasas positivas.

35 El documento WO 2006/107949 se refiere a un método para tratar trastornos de estrés oxidativo. La presente invención se refiere al tratamiento específico de células cancerosas ALT y afecciones no cancerosas caracterizadas por telómeros disfuncionales.

El documento CN1936011 se refiere a un compuesto oligonucleotídico antisentido de la enzima telómero de liposoma policatiónica que se compone de liposomas policatiónicos y oligonucleótidos antisentidos.

40 El documento WO2006028160 se refiere al conjugado oligonucleotídico de fosforotioato que tiene una alta actividad inhibidora contra la telomerasa contenida en un extracto de células leucémicas humanas y que proporciona un híbrido dúplex estable con un ADN complementario.

45 El documento US2006183704 se refiere a métodos para tratar trastornos hiperproliferativos, incluidos los cánceres, administrando a un mamífero afectado una cantidad eficaz de una composición que comprende pTT o una composición que comprende uno o más oligonucleótidos que comparten al menos el 50% de identidad de secuencia de nucleótidos con la repetición del saliente de los telómeros humanos.

50 El documento WO01/74342 se refiere a métodos de tratamiento o prevención de enfermedades hiperproliferativas o afecciones precancerosas que afectan a las células epiteliales, tales como psoriasis, vitiligo, dermatitis atópica o dermatosis hiperproliferativas o sensibles a los rayos UV, enfermedades hiperproliferativas o alérgicas de otros epitelios y métodos para reducir el fotoenvejecimiento, el estrés oxidativo o para la profilaxis contra la probabilidad de desarrollar cáncer de piel o su reducción.

El documento WO96/23508 describe un método para inhibir la proliferación del cáncer y otros estados de enfermedad celular de tipo inmortal. El método incluye la introducción de oligonucleótidos sintéticos que imitan a motivos de telómeros.

Sandra Sampl et al. (Proceedings: AACR Annual Meeting 2014; April 5-9, 2014; Abstract 2743, San Diego, CA), indican que las transcripciones de ARN de telómeros llamados TERRA se identificaron para bloquear la actividad de la telomerasa (TA) potencialmente a través de la unión directa a TERC.

5 Los TERRA son ARN no codificantes monocatenarios constitutivos, desde alrededor de 100 bases hasta al menos 9 kilobases de longitud (Azzalin et al., 2007). Se transcriben a partir de un promotor ubicado en la región subtelomérica, por lo tanto portan secuencias teloméricas tanto subteloméricas como ricas en G. De manera diferente, los DDRNA son ARN cortos (al menos 6 u 8 nucleótidos de largo o entre 10 y 50 nucleótidos de largo, alrededor de 22 nucleótidos de largo) que potencialmente pueden formar ARN de doble cadena. Se generan mediante el procesamiento de transcripciones precursoras, que se transcriben a partir de ambas cadenas teloméricas, generando moléculas de ARN que contienen repeticiones teloméricas ricas en G y en C, comenzando en el propio extremo de los telómeros o dentro de las repeticiones teloméricas.

El documento US 6 046 307 describe ácidos nucleicos peptídicos que son inhibidores de la telomerasa.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de tratamientos de enfermedades caracterizadas por un alargamiento alternativo de telómeros y afecciones no cancerosas asociadas con la disfunción de los telómeros.

15 **Compendio de la invención**

La presente invención se basa en el descubrimiento de que, tras el daño o la disfunción del ADN telomérico, se acumulan ARN no codificantes (denominados tDDRNA). Estas son transcripciones de ARN sintetizadas usando un telómero disfuncional como plantilla para la transcripción de un precursor de ARN largo, que luego puede ser procesado por Dicer y/o Drosha en ARN no codificantes (tDDRNA) más cortos.

20 En la presente invención, se descubrió sorprendentemente que los inhibidores de la generación y/o síntesis y/o funciones de tDDRNA y sus precursores también inhiben la activación de DDR y, por lo tanto, pueden aplicarse para el tratamiento de afecciones asociadas a ALT y afecciones asociadas con el daño del ADN telomérico o su disfunción.

25 Se sintetizaron oligonucleótidos antisentido (ASO), por ejemplo en forma de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) complementarios a tDDRNA y/o sus precursores, junto con LNA con secuencias no relacionadas como control negativo. Se observó que los ASO teloméricos pueden inhibir específicamente la activación de DDR, inhibiendo tanto la señalización como la posterior reparación del ADN.

Con un ASO de secuencia específica, se obtuvieron resultados que mostraron una disminución de la proliferación celular específicamente en células ALT.

30 La activación telomérica de DDR en tumores ALT puede ser dirigida por ASO de secuencia específica, lo que perjudica el mantenimiento de los telómeros y reduce su proliferación. Los inventores sintetizaron LNA ASO con la secuencia complementaria a los ARN teloméricos generados por daño o disfunción del ADN de los telómeros. Observaron que la transfección de un oligonucleótido ASO que portaba una secuencia telomérica específica era capaz de suprimir fuertemente la proliferación de líneas celulares positivas para ALT (es decir, líneas celulares de osteosarcoma U-2 OS y G292, líneas celulares de glioblastoma GBM14, fibroblastos W138 VA13 y SW26) mientras que la misma cantidad de ASO con una secuencia diferente que no se dirigía al ARN telomérico y que no se dirigía a ninguna secuencia humana, no tenía ningún efecto significativo. Es importante destacar que ninguno de estos ASO tiene ningún impacto en la proliferación de fibroblastos humanos normales (de origen mesenquimatoso como los osteosarcomas) o en la proliferación de células cancerosas con telomerasa positiva, según lo probado en paralelo, lo que sugiere que este enfoque es específico para tumores ALT e indica que este tratamiento no será tóxico ni en animales vivos ni en pacientes humanos. En esta etapa:

1) se ha identificado un nuevo agente terapéutico potencial;

2) se ha definido un subconjunto específico de tumores que podrían beneficiarse de un tratamiento con este agente. Además, el envejecimiento está asociado con la activación de DDR, especialmente en los telómeros (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Fumagalli et al., 2012; Herbig et al., 2006; Herbig et al., 2004; Hewitt et al., 2012). El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) (Pollex y Hegele, 2004) es un ejemplo de un síndrome de progeria causado por una forma mutante de lámina A, también llamada progerina. La progeria significa un envejecimiento prematuro. Los fenotipos progéricos de HGPS pueden suprimirse mediante la expresión de telomerasa, disminuyendo la señalización del daño de ADN inducido por progerina (Kudlow et al., 2008). Esto indica que el fenotipo progérico de las células HGPS (y de los pacientes con HGPS por extensión) está causado por telómeros disfuncionales que causan DDR. De hecho, DDR se encuentra en los telómeros en las células HGPS (Benson et al., 2010; Chojnowski et al., 2015). El pez Danio rerio (pez cebra) es un modelo de vertebrado simple, adecuado para realizar estudios sobre el envejecimiento. De hecho, se ha demostrado que la mutación de la telomerasa acelera el envejecimiento fisiológico al acelerar el acortamiento de los telómeros y la consiguiente disfunción de los telómeros y la activación de DDR (Henriques et al., 2013). Específicamente, los peces mutantes de la telomerasa se caracterizan por una vida útil más corta, atrofia tisular y una disminución de la fertilidad. Representan un modelo de afección no cancerosa asociada con la disfunción de los telómeros.

Al usar los ASO de LNA con la secuencia complementaria a los tDDRNA y sus precursores generados por el daño o la disfunción del ADN de los telómeros, los inventores evitaron la senescencia celular en las células que expresaban progerina. Además, extendieron la vida útil de un modelo de ratón para HGPS y del pez cebra mutante de telomerasa, lo que sugiere que podrían suprimir los fenotipos relacionados con el envejecimiento.

- 5 En la presente invención, la inhibición de DDR a través de la inhibición de DDRNA y/o sus precursores tiene la gran ventaja de ser específica de secuencia, minimizando así la posibilidad de efectos secundarios adversos en células normales debido, por ejemplo, a la inhibición de DDR lejos de los telómeros.

Además, en el contexto de la terapéutica del cáncer, estos inhibidores pueden sinergizar con los inhibidores de la telomerasa para evitar la posible aparición de clones de células cancerosas utilizando el mecanismo ALT de mantenimiento de los telómeros y, por lo tanto, resistentes a las inhibiciones de la telomerasa.

De hecho, las terapias contra el cáncer existentes son tratamientos eficaces contra el cáncer que actúan dañando el ADN o inhibiendo la DDR en las células cancerosas. Sin embargo, la actividad dañina del ADN o la inhibición de DDR de la mayoría de ellos no es específica de secuencia. Los oligonucleótidos de la presente invención dañan la DDR de una manera específica de secuencia, luego también pueden conferir una especificidad de secuencia frente a los tratamientos dañinos del ADN existentes, mejorando así la eficacia.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un oligonucleótido que comprende una de las siguientes secuencias:

(TTAGGG) SEQ ID No. 1, (TAGGGT) SEQ ID No. 2, (AGGGTT) SEQ ID No. 3, (GGGTTA) SEQ ID No. 4, (GGTTAG) SEQ ID No. 5 o (GTTAGG) SEQ ID No. 6 o una variante o una mezcla de los mismos para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad caracterizada por el alargamiento alternativo de los telómeros, en el que la variante comprende una de las siguientes secuencias TCAGGG, TTCGGG, GTAGGG, TGAGGG, TTGGGG, TAAGGG, ATAGGG, CTAGGG, TTTGGG o TTAAGGG.

Preferiblemente, el oligonucleótido o una variante del mismo comprende una de las siguientes secuencias: (TTAGGG)_n, (TAGGGT)_n, (AGGGTT)_n, (GGGTTA)_n, (GGTTAG)_n o (GTTAGG)_n, donde 1 < n < 1000, preferiblemente 1 < n < 500, preferiblemente 1 < n < 200, preferiblemente 1 < n < 100, preferiblemente 1 < n < 50, preferiblemente 1 < n < 20, preferiblemente 1 < n < 10, preferiblemente 1 < n < 5.

Preferiblemente, dicho oligonucleótido es complementario con la secuencia de un ARN, siendo dicho ARN un transcrito de ARN sintetizado usando un ADN telomérico disfuncional específico como plantilla para la transcripción o un fragmento de dicho transcrito de ARN, generando dicho fragmento (DDRNA) mediante el procesamiento de Dicer y/o Drosha.

- 30 Preferiblemente, la enfermedad es un cáncer o una infección por el virus de Epstein-Bar. Aún más preferiblemente, la enfermedad es un cáncer ALT positivo.

Sin embargo, preferiblemente el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: sarcoma de tejidos blandos, preferiblemente condrosarcoma, sarcomas pleomórficos indiferenciados que incluyen histiocitoma fibroso maligno, leiomiomasarcoma, sarcoma epiteliode, liposarcoma, fibrosarcoma y variantes, angiosarcoma y neurofibroma, cáncer del sistema nervioso central, preferiblemente astrocitoma difuso en grado 2; astrocitoma anaplásico en grado 3; glioblastoma pediátrico en grado 4 multiforme, oligodendroglioma, meduloblastoma anaplásico, astrocitoma pilocítico en grado 1, meduloblastoma no anaplásico, meningioma, schwannoma, cáncer de vejiga urinaria, en particular el carcinoma de células pequeñas y el carcinoma urotelial invasivo, cáncer de glándula suprarrenal, cáncer del sistema nervioso periférico, en particular ganglioneuroblastoma, neuroblastoma y feocromocitoma, neoplasias neuroendocrinas como paraganglioma y tumor carcinoide, cáncer de riñón, en particular carcinoma cromóforo, carcinoma sarcomatoide y carcinomas de células claras y papilares, cáncer de pulmón y pleural, en particular mesotelioma maligno, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas, cáncer de piel tal como melanoma maligno, cáncer de hígado tal como carcinoma hepatocelular, cáncer de testículo tal como tumor de células germinales no seminomatosas, cáncer de mama, en particular carcinoma lobular; carcinoma ductal y carcinoma medular, cáncer de útero como el carcinoma seroso de endometrio, carcinoma escamoso de cuello uterino, cáncer de ovario, en particular carcinoma de células claras, carcinoma endometriode, cáncer de vesícula biliar como adenocarcinoma, cáncer de esófago.

En otro aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que comprende una de las siguientes secuencias: (TTAGGG) SEQ ID No. 1, (TAGGGT) SEQ ID No. 2, (AGGGTT) SEQ ID No. 3, (GGGTTA) SEQ ID No. 4, (GGTTAG) SEQ ID No. 5 o (GTTAGG) SEQ ID No. 6 o una secuencia complementaria del mismo o un fragmento o una variante o una mezcla de los mismos para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una afección no cancerosa asociada con la disfunción telomérica, en el que la variante comprende una de las siguientes secuencias: TCAGGG, TTCGGG, GTAGGG, TGAGGG, TTGGGG, TAAGGG, ATAGGG, CTAGGG, TTTGGG o TTAAGGG.

Preferiblemente, el oligonucleótido o una variante del mismo comprende una de las siguientes secuencias: (TTAGGG)_n, (TAGGGT)_n, (AGGGTT)_n, (GGGTTA)_n, (GGTTAG)_n o (GTTAGG)_n, donde 1 < n < 1000, preferiblemente 1 < n < 500, preferiblemente 1 < n < 200, preferiblemente 1 < n < 100, preferiblemente 1 < n < 50, preferiblemente 1 < n < 20, preferiblemente 1 < n < 10, preferiblemente 1 < n < 5.

5 Preferiblemente, la afección no cancerosa asociada con la disfunción de los telómeros se selecciona del grupo que consiste en: síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de ataxia telangiectasia, FPI familiar, FPI esporádica, anemia aplásica, disqueratosis autosómica dominante congénita, MDS-AML familiar, disqueratosis congénita de novo, disqueratosis congénita recesiva ligada al cromosoma X, síndrome de Hoyeraal-Hreiderasson, síndrome de Revesz, disqueratosis congénita autosómica recesiva, síndrome de Coats plus, afección causada por mutaciones o inactivación de cualquiera de TRF1, POT1, TPP1, TINF2, RAP1 o TRF2, deterioro de la regeneración tras hepatectomía parcial, fibrosis hepática, inflamación hepática crónica, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, diferenciación progenitora mielóide alterada, insuficiencia de la médula ósea, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos neurológicos que incluyen la enfermedad de Alzheimer, osteoporosis, aterosclerosis, enfermedad cardíaca, distrofia muscular de Duchenne, diabetes tipo 2, alteración de la fertilidad, alteración de la cicatrización de heridas, artritis, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad, envejecimiento.

Preferiblemente, el oligonucleótido es un oligonucleótido modificado con el ácido nucleico bloqueado (LNA) o un oligonucleótido modificado con 2'-o-metilo.

15 Generalmente, se considera que el LNA es un imitador del ARN en el que el resto de azúcar ribosa está bloqueado por un puente de oximetileno que conecta los átomos de C(2') y C(4') que restringen conformacionalmente los monómeros de LNA en un fruncido de azúcar de tipo N (Veedu R et al., 2010). LNA es una molécula que contiene al menos un nucleótido que lleva la modificación de LNA. Preferiblemente, el LNA contiene, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20 nucleótidos que llevan la modificación del LNA.

20 El oligonucleótido modificado con 2'-o-metilo es una molécula que contiene al menos un nucleótido que lleva la modificación 2'-o-metilo. Preferiblemente, el oligonucleótido modificado con 2'-o-metilo contiene al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20 nucleótidos que llevan la modificación 2'-o-metilo.

25 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido como se definió anteriormente y vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad caracterizada por el alargamiento alternativo de los telómeros o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una afección no cancerosa asociada con la disfunción telomérica.

30 Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende además al menos otro agente terapéutico, preferiblemente el otro agente terapéutico se selecciona del grupo de: agente antitumoral, agente contra el dolor, agente antiemético (tal como aprepitant, fosaprepitant, Dolasetron, granisetron, ondansetrón, palonosetrón, tropisetron o ramosetrón, dexametasona).

35 Preferiblemente, el otro agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: inhibidor de ATR, inhibidor de DDR, inhibidor de HR, molécula que se dirige específicamente a los telómeros, preferiblemente moléculas de interacción de cuádruplex G, molécula que causa la generación del daño del ADN, específicamente en los telómeros.

En la presente invención, los DDRNA son ARN no codificantes. Son transcripciones de ARN sintetizadas utilizando un ADN telomérico dañado y/o disfuncional específico como plantilla para la transcripción de un precursor de ARN largo que luego puede ser procesado por Dicer y/o Drosha en ARN no codificantes más cortos (DDRNA o tDDRNA).

40 Los DDRNA se originan en el locus y transportan la secuencia del locus dañado. Cuando DICER y/o DROSHA sintetizan químicamente o generan in vitro la escisión de las transcripciones que abarcan el locus, los DDRNA promueven la activación de DDR en el sitio del daño del ADN en las células tratadas con RNasa A, incluso en ausencia de otros ARN de mamíferos.

Los DDRNA actúan de manera diferente a los microRNA y los mecanismos canónicos de RNAi porque, como se muestra en (Francia et al., 2012):

- 45
- Los DDRNA actúan sin la necesidad de ningún otro ARN celular (ver los resultados obtenidos con ARN extraído en gel y ARN sintético en experimentos con células tratadas con RNasa A).
 - Los DDRNA pueden tener una secuencia (repeticiones LAC o TET) que no coinciden con las transcripciones celulares endógenas y aún así son biológicamente activas.
 - Los DDRNA pueden actuar rápidamente (en minutos) a temperatura ambiente en células inhibidas para la transcripción y traducción (ver los resultados obtenidos en experimentos con células tratadas con RNasa A).
 - La inactivación de las proteínas GW (efectores de los miARN canónicos) no afecta los focos DDR.
- 50

Los DDRNA son ARN pequeños, con el potencial de formar pares bicatenarios, se generan mediante el procesamiento por DICER y/o DROSHA de un transcrito de ARN específico de secuencia sintetizado tras la transcripción de un locus de ADN dañado. Los DDRNA son pequeños ARN de una longitud entre 10 y 50

nucleótidos. Por ejemplo, una longitud entre 17 y 32 nucleótidos. Por ejemplo, de una longitud entre 20 y 25 nucleótidos. Por ejemplo, de una longitud entre 21 y 23 nucleótidos.

5 Dichos DDRNA funcionan favoreciendo la acumulación específica de secuencia de factores DDR en sitios específicos de daño en el ADN y promueven la activación de DDR (es decir, que comprenden, entre otros, la señalización del daño en el ADN, tal como a través de eventos de fosforilación de proteínas y reparación del daño en el ADN, tales como la recombinación homóloga).

10 Los precursores de DDRNA son moléculas de ARN más largas que los DDRNA (al menos 25 bases de longitud, preferiblemente al menos 30 bases de longitud, preferiblemente al menos 50 bases de longitud, preferiblemente al menos 100 bases de longitud, preferiblemente al menos 150 bases de longitud, preferiblemente al menos 200 bases de longitud, preferiblemente al menos 250 bases de longitud, preferiblemente al menos 300 bases de longitud), transcritas al daño del ADN, usando el ADN dañado como plantilla. DROSHA y/o DICER los procesan para generar DDRNA. Los precursores de DDRNA teloméricos son múltiplos de DDRNA teloméricos.

15 En la presente invención, un fragmento de SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 6 es un fragmento funcional que tiene la misma actividad terapéutica que dichas secuencias. El fragmento corresponde a los oligonucleótidos de la presente invención que están truncados por uno o más nucleótidos en el extremo 5', el extremo 3' o ambos, el extremo 5' y el extremo 3', siempre que al menos dos nucleótidos contiguos de los oligonucleótidos no truncados permanezcan. Preferiblemente, los oligonucleótidos truncados tienen 2, 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos encontrados en los oligonucleótidos no truncados.

20 En la presente invención también se incluyen los oligonucleótidos que comprenden las secuencias anteriores (SEQ ID No. 1 a 6) que se repiten 1 o más veces, por ejemplo los oligonucleótidos que comprenden una de las siguientes secuencias: (TTAGGG)_n, (TAGGGT)_n, (AGGGTT)_n, (GGGTTA)_n, (GGTTAG)_n o (GTTAGG)_n, donde 1 < n < 1000, preferiblemente 1 < n < 500, preferiblemente 1 < n < 200, preferiblemente 1 < n < 100, preferiblemente 1 < n < 50, preferiblemente 1 < n < 20, preferiblemente 1 < n < 10, preferiblemente 1 < n < 5.

25 Los oligonucleótidos también pueden tener 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, etc.. nucleótidos de longitud. No son necesariamente múltiples de 6 nucleótidos.

30 En la presente invención, la variante de SEQ ID No. 1 a 6 son oligonucleótidos en los que 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos están sustituidos con un nucleótido diferente. Las variantes tienen al menos 50% de identidad con la SEQ ID No. 1 a 6, preferiblemente al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 95% de identidad. La variante tiene la misma actividad terapéutica que el oligonucleótido. Las variantes de hexanucleótidos teloméricos preferidos incluyen: TCAGGG, TTCGGG, GTAGGG, TGAGGG, TTGGGG, TAAGGG, ATAGGG, CTAGGG, TTTGGG, TTAAGGG y sus secuencias complementarias (Figura 5 de (Lee et al., 2014)).

El oligonucleótido de la presente invención, su fragmento o variante del mismo es complementario con la secuencia de DDRNA y/o sus precursores, inhibiendo así la función de DDRNA y/o sus precursores.

35 Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula de LNA o un oligonucleótido modificado con 2'-o-metilo.

40 Estos oligonucleótidos comprenden, entre otros, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos modificados con fosforotioato, ácidos nucleicos bloqueados modificados con fosforotioato, oligonucleótidos modificados con 2'-o-metoxietilo, oligonucleótidos modificados con 2'-o-metilo, 2'-o-[2-(N-Metilcarbamoil)etil]ribonucleósidos, metilfosfonatos, oligonucleótidos de morfolino, oligonucleótidos gapmer LNA-DNA-LNA, mezcladores, gapmer quimérico 2'-o-metil RNA-DNA, fosforoamidato N3'-P5', ácido nucleico 2'-fluoro-arabino, fosforamidato morfolino, ácido nucleico de ciclohexeno, ADN triciclo, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico desbloqueado, ácido nucleico de hexitol, oligonucleótidos de boranofosfato, oligonucleótidos de fosfoamidato, preferiblemente dicho oligonucleótido modificado está fosforotioado y/u oligonucleótidos expresados por genes codificados por plásmidos entregados por diferentes medios (que comprenden, entre otros, la transfección de plásmidos y la infección viral).

45 En la presente invención, una enfermedad caracterizada por un alargamiento alternativo de los telómeros es una enfermedad caracterizada por la presencia de células que mantienen los telómeros a pesar de la falta de actividad de la telomerasa y/o que muestran una o más de las características enumeradas a continuación.

En particular, el alargamiento alternativo de los telómeros se puede identificar/medir por al menos una de las siguientes características:

- 50
- falta de actividad de la telomerasa (por ejemplo, medida por ensayos enzimáticos)
 - presencia de telómeros más largos y más heterogéneos, en comparación con las células positivas a la telomerasa, medido por el fragmento de restricción de telómeros y el análisis de transferencia Southern, u otros medios basados en la hibridación in situ.

- presencia de cuerpos de PML asociados a ALT (APB), que son focos de proteína de PML, que se localizan junto con la cromatina telomérica, tal como se detecta por inmunofluorescencia.
- presencia de marcadores DDR tales como (γ H2AX, RPA, proteínas HR) que se localizan conjuntamente en los telómeros, como se detecta por inmunofluorescencia u otros medios.
- 5 - presencia de mutaciones en genes ATRX y/o DAXX o expresión o funciones alteradas de los mismos (Heaphy et al., 2011).
- Presencia de círculos c, que son ADN teloméricos extracromosómicos ricos en c de cadena sencilla.
- Presencia de círculos t, que son ADN teloméricos bicatenarios extracromosómicos.
- Intercambio de cromátidas hermanas de los telómeros, un marcador de recombinación entre los telómeros.
- 10 - Aumento de la inestabilidad de repetición en tándem en el locus minisatélite MS32.

Estas características pueden medirse/identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se muestra en (Henson y Reddel, 2010) (incluidos en este documento como referencia).

15 En la presente invención, una afección no cancerosa asociada con la disfunción de los telómeros es una enfermedad o afección o síndrome caracterizado por telómeros que se aplican a los componentes de la maquinaria DDR. En la presente invención, la "disfunción telomérica" o "telómero disfuncional" es un telómero con ADN telomérico dañado y/o un ADN telomérico críticamente corto y/o ADN telomérico sin tapa y/o ADN telomérico desprotegido y/o pérdida de telómero acelerada y/o cualquier instancia donde la señal DDR esté activa en un telómero.

20 La disfunción de los telómeros tiene un papel causal en una serie de trastornos degenerativos. Su manifestación abarca estados de enfermedad comunes como el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), el síndrome de Werner, el síndrome de Bloom, la ataxia telangiectasia, IPF familiar, IPF esporádica, anemia aplásica, disqueratosis congénita autosómica dominante, MDS-AML familiar, disqueratosis congénita de novo, disqueratosis congénita recesiva ligada al cromosoma X, síndrome de Hoyeraal-Hreiderasson, síndrome de Revesz, disqueratosis congénita autosómica recesiva, síndrome de Coats plus, afección causada por mutaciones o inactivación de cualquiera de TRF1, POT1, TPP1, TINF2, RAP1 o TRF2, regeneración deteriorada tras hepatectomía parcial, fibrosis hepática, inflamación crónica hepática, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, diferenciación progenitora mieloide alterada, insuficiencia de médula ósea, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos neurológicos, incluida la enfermedad de Alzheimer, osteoporosis, aterosclerosis, enfermedad cardíaca, distrofia muscular de Duchenne, diabetes tipo 2, fertilización deteriorada y, cicatrización alterada de heridas, artritis, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad, envejecimiento. Por ejemplo, se ha propuesto que la pérdida acelerada de telómeros, es decir, la disfunción telomérica, es un factor que conduce a la insuficiencia orgánica terminal en enfermedades crónicas de alto recambio celular como la cirrosis hepática (Rudolph et al. 2000).

35 Aunque estos trastornos parecen ser clínicamente diversos, en conjunto comprenden un espectro de síndromes caracterizados por telómeros cortos o dañados y más ampliamente disfuncionales, y la disfunción de los telómeros también es una característica clave del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con el envejecimiento y la edad (véase (Armanios y Blackburn, 2012; Gray et al., 2015; Opresko y Shay, 2016; Wang et al., 2015; Xi et al., 2013; Satyanarayana et al, 2003; Rudolph et al. 2000)).

40 La disfunción adicional de los telómeros puede estar causada por mutaciones o inactivación, en particular de TRF1 (nombre oficial TERF1, ID gen 7013), POT1 (ID gen 25913), TPP1 (nombre oficial ACD, ID gen 65057), TINF2 (ID gen 26277), RAP1 (nombre oficial TERF2IP, ID gen L5 54386) o TRF2 (nombre oficial TERF2, ID gen 7014).

Además, los modelos TRF2KO causan una cierta disfunción telomérica y recapitulan las condiciones no cancerosas asociadas con la disfunción telomérica.

45 La disfunción de los telómeros puede identificarse/medirse mediante al menos una de las siguientes características o métodos: inmunofluorescencia indirecta, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación de cromatina, detección de tDDRNA.

50 Más específicamente, la invención se refiere al uso de polinucleótidos, oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos o dímeros de dinucleótidos, o compuestos similares, para la inhibición de la proliferación celular o la inhibición de la reparación del ADN. Como se usa en el presente documento, la inhibición de la proliferación celular incluye la abrogación completa de la división celular, la inhibición parcial de la división celular y la inhibición transitoria de la división celular, muerte celular, apoptosis, necrosis, senescencia celular, diferenciación celular, catástrofe mitótica medida por pruebas estándar en la técnica y como se describe en los Ejemplos. La invención también se refiere a la prevención y/o al tratamiento de enfermedades caracterizadas por ALT, que incluyen, entre otras, el cáncer y las afecciones precancerosas, en las que la enfermedad afecta a células de cualquier órgano y

cualquier origen embrionario. Los tumores y los cánceres ALT metastásicos que han vuelto a crecer o han recaído después del tratamiento, así como los tumores primarios, pueden tratarse mediante los métodos de la invención.

En una realización, las composiciones de la presente invención comprenden oligonucleótidos de aproximadamente 2-200 bases de longitud, que pueden administrarse a un mamífero (p. ej., un ser humano) en un vehículo apropiado. En otra realización, los oligonucleótidos tienen una longitud de aproximadamente 5 a 100 nucleótidos. En otra realización más, los oligonucleótidos tienen una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nucleótidos. En otra realización más, los oligonucleótidos de ADN tienen aproximadamente 8-30 nucleótidos de longitud. Preferiblemente tienen una longitud de 8-21 nucleótidos, aún más preferiblemente, una longitud de 8-16 nucleótidos.

Se espera razonablemente que cualquier método adecuado para administrar el oligonucleótido de la presente invención al organismo, de manera que el oligonucleótido entre en contacto y/o entre en las células o tejidos de interés, sea eficaz. Los efectos se pueden optimizar utilizando protocolos de optimización de rutina.

El oligonucleótido, los desoxinucleótidos de la presente invención pueden obtenerse de cualquier fuente apropiada, o pueden producirse sintéticamente.

Fragmentos de ADN, oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos o dímeros de dinucleótidos, se pueden aplicar a la piel y se pueden administrar solos o en combinación con vehículos fisiológicamente aceptables, incluidos disolventes, perfumes o colorantes, estabilizadores, protectores solares u otros ingredientes, para un uso médico o un uso cosmético. Se pueden administrar en un vehículo, como agua, solución salina o en otro vehículo de administración apropiado. El vehículo de administración puede ser cualquier vehículo apropiado, que administre los oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos o dímeros de dinucleótidos. En una realización, el intervalo de concentración del oligonucleótido puede ser de 0,1 nM a 500 μ M, preferiblemente el intervalo in vitro está entre 0,2 nM y 300 μ M, preferiblemente el intervalo in vitro está entre 0,5 nM y 200 μ M. El intervalo in vivo preferido es 0,1-500 mg/kg, preferiblemente el intervalo in vivo es 1-50 mg/kg.

Para permitir el acceso de los ingredientes activos de la composición a las células de la piel más profundas, son útiles vehículos que mejoran la penetración a través de las capas externas de la piel, p. ej., el estrato córneo. Los componentes del vehículo para este propósito incluyen, entre otros, etanol, isopropanol, éteres de dietilenglicol tales como dietilenglicol monoetil éter, azona (1-dodecilazacloheptan-2-ona), ácido oleico, ácido linoleico, propilenglicol, concentraciones hipertónicas de glicerol, ácido láctico, ácido glicólico, ácido cítrico y ácido málico.

En una realización, el propilenglicol se usa como vehículo de administración. En una realización preferida, se usa una mezcla de propilenglicol:etanol:miristato de isopropilo (1:2,7:1) que contiene 3% de ácido bencilsulfónico y 5% de alcohol oleílico.

En otra realización, se puede usar una preparación de liposomas. La preparación de liposomas puede comprender liposomas que penetran en las células de interés o en el estrato córneo, y se fusionan con la membrana celular, dando como resultado el suministro del contenido del liposoma a la célula. Por ejemplo, pueden ser usados liposomas tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 5.077.211 de Yarosh, Patente de Estados Unidos Nº 4.621.023 de Redziniak et al. o la Patente de Estados Unidos Nº 4.508.703 de Redziniak et al. Las composiciones de la invención destinadas a tratar afecciones de la piel pueden administrarse antes, durante o después de la exposición de la piel del mamífero a los rayos UV o agentes que causan daño oxidativo. Otras formulaciones adecuadas pueden emplear niosomas. Los niosomas son vesículas lipídicas similares a los liposomas, con membranas que consisten principalmente en lípidos no iónicos, algunas de las cuales son efectivas para transportar compuestos a través del estrato córneo.

Otros métodos de administración adecuados destinados principalmente a la piel incluyen el uso de una formulación de hidrogel que comprende un medio acuoso o acuoso-alcohólico y un agente gelificante además del oligonucleótido(s). Agentes gelificantes adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbómero (carbopol), hipano, poliacrilato y poliacrilato de glicerol.

En una realización, los oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos, dímeros de dinucleótidos, o la composición que comprende uno o más de los anteriores, se aplica tópicamente a la superficie de la piel. En otras realizaciones, los oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos, dímeros de dinucleótidos, o la composición que comprende uno o más de los anteriores, se administran a otras células o tejidos del cuerpo tales como las células epiteliales. Las células de tejido, que se sabe que tienen una barrera menor para la entrada de tales sustancias que la piel, pueden tratarse, p. ej., oralmente en la cavidad oral; por aerosol en el epitelio respiratorio; por instilación en el epitelio de la vejiga; por instilación o supositorio al intestino (epitelio) o por otro medio de aplicación tópica o superficial a otras células o tejidos del cuerpo, incluidas gotas para los ojos, gotas nasales y una aplicación mediante angioplasia, por ejemplo. Además, los oligonucleótidos de la presente invención pueden administrarse por vía intravenosa o inyectarse directamente en el tejido de interés por vía intracutánea, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Además, para el tratamiento de las células sanguíneas, los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía intravenosa o durante la circulación extracorpórea de las células, tal como a través de un dispositivo de fotoforesis, por ejemplo. Como se demuestra en este documento, todo lo que se necesita es poner en contacto las células de interés con las composiciones de oligonucleótidos de la presente invención.

Los oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos, dímeros de dinucleótidos, agentes que promueven la diferenciación o una composición que comprende uno o más de los anteriores, se administran (se introducen o se ponen en contacto) con las células de interés de una manera apropiada.

5 Las "células de interés", tal como se usan en el presente documento, son aquellas células que pueden verse afectadas o que están ya afectadas por alguna enfermedad caracterizada por ALT o por telómeros disfuncionales.

10 Los oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos, dímeros de dinucleótidos, agentes que promueven la diferenciación, o composiciones que comprenden alguno o más de los anteriores, se aplican en un momento apropiado en una cantidad efectiva. El "tiempo apropiado" variará, dependiendo del tipo y el peso molecular de los oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos, dímeros de dinucleótidos u otros agentes empleados, la condición a tratar o prevenir, los resultados buscados y el paciente individual.

15 Una "cantidad efectiva", tal y como se usa en este documento, es una cantidad o concentración suficiente para lograr algún resultado deseado medible. La cantidad efectiva dependerá del tipo y del peso molecular de los oligonucleótidos, desoxinucleótidos, dinucleótidos, dímeros de dinucleótidos o agentes empleados, la condición a tratar o prevenir, los resultados buscados y el paciente individual. Por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de la enfermedad hiperproliferativa ALT, condiciones cancerosas o precancerosas, la cantidad efectiva es la cantidad necesaria para reducir o aliviar cualquiera de los síntomas de la enfermedad, para reducir el volumen, el área o el número de células afectadas por la enfermedad, para prevenir la formación de áreas afectadas o para reducir la tasa de crecimiento de las células afectadas por el trastorno hiperproliferativo.

20 Como se demuestra en este documento, los inhibidores de la presente invención son activos in vitro e in vivo en su forma no modificada, p. ej., secuencias de oligonucleótidos no modificados unidos por enlaces fosfodiéster. Como se usa en el presente documento, los términos "oligonucleótido", "dinucleótido", etc., se refieren a moléculas que tienen ribosa y/o desoxirribosa como azúcar, y que tienen enlaces fosfodiéster ("esqueleto de fosfato") como ocurre naturalmente, a menos que algún enlace o estructura diferente esté especificado.

25 Los oligonucleótidos son polinucleótidos relativamente cortos. Los polinucleótidos son polímeros lineales de monómeros de nucleótidos en los que los nucleótidos están unidos por enlaces fosfodiéster entre la posición 3' de un nucleótido y la posición 5' del nucleótido adyacente. A menos que se indique lo contrario, los "oligonucleótidos" de la invención, como se describe en el presente documento, tienen una cadena principal de fosfodiéster.

30 Para mejorar la administración a través de la piel, los oligonucleótidos de la invención pueden modificarse para enmascarar o reducir sus cargas negativas o modificar sus características químicas. Esto puede lograrse, por ejemplo, preparando sales de amonio de los oligonucleótidos usando reactivos y métodos fácilmente disponibles reconocidos en la técnica. Las sales de amonio preferidas de los oligonucleótidos incluyen sales de trimetil, trietil, tributil, tetrametil, tetraetil y tetrabutilamonio.

35 El amonio y otros grupos cargados positivamente pueden unirse de manera covalente al oligonucleótido para facilitar su transporte a través del estrato córneo, utilizando un enlace enzimáticamente degradable que libera el oligonucleótido al llegar al interior de las células de las capas viables de la epidermis.

Otro método para reducir o enmascarar la carga negativa de los oligonucleótidos incluye agregar un espaciador de polioxietileno a los grupos fosfato 5' de los oligonucleótidos y/o los fosfatos internos de los oligonucleótidos utilizando métodos y reactivos reconocidos en la técnica. Esto, en efecto, agrega un modificador (enlazador) de 6 o 12 carbonos al fosfato que reduce la carga negativa neta en +1 y hace que los oligonucleótidos sean menos hidrófilos.

40 Se logra una mayor reducción de la carga negativa mediante la adición de una fosforoamidita al extremo del enlazador de polioxietileno, proporcionando así una carga positiva neutralizante adicional. La cadena principal del fosfodiéster de los oligonucleótidos de la presente invención también puede modificarse o sintetizarse para reducir la carga negativa. Un método preferido implica el uso de ácidos metilfosfónicos (o quiral-metilfosfonatos), mediante el cual uno de los átomos de oxígeno cargados negativamente en el fosfato se reemplaza con un grupo metilo. Estos oligonucleótidos son similares a los oligonucleótidos que tienen enlaces de fosforioato que comprenden un sulfato en lugar de un grupo metilo y que también están dentro del alcance de la presente invención.

Los oligonucleótidos de la presente invención también pueden tomar la forma de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) en los que las bases de los nucleótidos están conectadas entre sí a través de un esqueleto peptídico.

50 Otras modificaciones de los oligonucleótidos tales como las descritas, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos números 6.537.973 y 6.506.735, así como en (Stenvang et al., 2012) (todas las cuales se incorporan en este documento como referencia para todas las modificaciones de oligonucleótidos descritas allí) y otras más, serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

55 Los oligonucleótidos también pueden ser oligonucleótidos "quiméricos" que se sintetizan para presentar una combinación de dos o más enlaces troncales químicamente distintos, siendo uno de los cuales el fosfodiéster. En una realización, los oligonucleótidos quiméricos están con uno o más enlaces fosfodiéster en el extremo 3'. En una

realización, los oligonucleótidos quiméricos están con uno o más enlaces fosfodiéster en el extremo 5'. En otra realización, los oligonucleótidos quiméricos están con uno o más enlaces fosfodiéster en los extremos 3' y 5'.

El oligonucleótido u oligonucleótidos, que se utilizarán para tratar y/o prevenir una enfermedad caracterizada por un alargamiento alternativo de los telómeros, como el cáncer o una infección por el virus de Epstein-Bar, en particular el sarcoma de tejidos blandos, preferiblemente condriosarcoma, sarcomas pleomórficos indiferenciados que incluyen histiocitoma fibroso maligno, leiomiomasarcoma, sarcoma epitelióide, liposarcoma, fibrosarcoma y variantes, angiosarcoma y neurofibroma, cáncer del sistema nervioso central, preferiblemente astrocitoma difuso de grado 2; astrocitoma anaplásico de grado 3; glioblastoma pediátrico de grado 4 multiforme, oligodendroglioma, meduloblastoma anaplásico, astrocitoma pilocítico de grado 1, meduloblastoma no anaplásico, meningioma, schwannoma, cáncer de vejiga urinaria, en particular, carcinoma de células pequeñas y carcinoma urotelial invasivo, cáncer de glándula suprarrenal o cáncer del sistema nervioso periférico, en particular ganglioneuroblastoma, neuroblastoma y feocromocitoma, neoplasias neuroendocrinas como paraganglioma y tumor carcinoide, cáncer de riñón, en particular carcinoma cromóforo, carcinoma sarcomatoide y carcinomas de células claras y papilares, cáncer de pulmón y pleural, en particular mesotelioma maligno, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas, cáncer de piel tal como melanoma maligno, cáncer de hígado tal como carcinoma hepatocelular, cáncer de testículo tal como tumor de células germinales no seminomatosas, cáncer de mama, en particular carcinoma lobular; carcinoma ductal y carcinoma medular, cáncer de útero como el carcinoma seroso de endometrio, carcinoma escamoso de cuello uterino, cáncer de ovario, en particular carcinoma de células claras, carcinoma endometriode, cáncer de vesícula biliar como adenocarcinoma, cáncer de esófago, o para tratar y/o prevenir su uso en el tratamiento y/o la prevención de una afección no cancerosa asociada con la disfunción de los telómeros, en particular el síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS), el síndrome de Werner, el síndrome de Bloom, la ataxia telangiectasia, la FPI familiar, la FPI esporádica, la anemia aplásica, la disqueratosis autosómica dominante congénita, MDS-AML familiar, disqueratosis congénita de novo, disqueratosis congénita recesiva ligada al cromosoma X, síndrome de Hoyeraal-Hreiderasson, síndrome de Revesz, disqueratosis congénita autosómica recesiva, síndrome de Coats plus, afección causada por mutaciones o inactivación de cualquiera de TRF1, POT1, TPP1, TINF2, RAP1 o TRF2, regeneración deteriorada tras hepatectomía parcial, fibrosis hepática, inflamación crónica del hígado, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, diferenciación progenitora mieloide alterada, insuficiencia de la médula ósea, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos neurológicos que incluyen enfermedad de Alzheimer, osteoporosis, aterosclerosis, enfermedad cardíaca, distrofia muscular de Duchenne, diabetes tipo 2, deterioro de la fertilidad, deterioro de la cicatrización de heridas, artritis, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad, envejecimiento.

Por ejemplo, tales enfermedades se describen en (Durant, 2012) (adjuntas en este documento como referencia).

Los oligonucleótidos se pueden usar en una composición en combinación con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable. Dicha composición también puede contener además diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizantes y otros materiales reconocidos en la técnica. Los lípidos catiónicos como DOTAP [N-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio pueden usarse con oligonucleótidos para mejorar la estabilidad. Los oligonucleótidos pueden formar complejos con copolímeros PLGA/PLA, quitosano o copolímeros de ácido fumárico/ácido sebáico para una biodisponibilidad mejorada {donde PLGA es [poli(lactida-co-glicólido)]; PLA es poli(L-lactida)}. Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" significan un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración.

La composición que se utilizará como agente antiproliferativo para la enfermedad de ALT puede contener además otros agentes que potencien la actividad del oligonucleótido u oligonucleótidos o complementen su actividad o uso en el tratamiento, como agentes quimioterapéuticos o radiactivos. Tales factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición para producir un efecto sinérgico con el(los) oligonucleótido(s) o para minimizar los efectos secundarios. Además, la administración de la composición de la presente invención puede administrarse simultáneamente con otras terapias, p. ej., administradas junto con un régimen de quimioterapia o radioterapia. Los oligonucleótidos que se describen en el presente documento pueden usarse en combinación con otras composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, un tumor puede tratarse convencionalmente con cirugía, radiación, quimioterapia o inmunoterapia, combinadas con terapias de oligonucleótidos, y luego los oligonucleótidos pueden administrarse posteriormente al paciente para extender la latencia de las micrometastasis y estabilizar e inhibir el crecimiento de cualquier residuo tumoral primario. Los oligonucleótidos se pueden usar en combinación con inhibidores de la telomerasa para prevenir la expansión de los clones ALT-positivos negativos para la telomerasa.

Preferiblemente, el otro agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: inhibidor de ATR, inhibidor de DDR, inhibidor de HR, molécula que se dirige específicamente y/o causa la generación de un daño en el ADN específicamente en telómeros, preferiblemente moléculas que interaccionan con G-cuadruplexes.

En la presente invención, un inhibidor de ATR es un compuesto de molécula pequeña capaz de inhibir la actividad quinasa de ATR que comprende, entre otros, a VE-821 (Vertex Pharmaceuticals), VE-822 (Vertex Pharmaceuticals), AZ20 (AstraZeneca), AZD6738 (AstraZeneca) (como se describe en (Flynn et al., 2015; Weber y Ryan, 2015) (todas las referencias se incorporan por referencia).

Un inhibidor de DDR es cualquier enfoque compuesto o experimental capaz de perjudicar o inhibir el proceso celular conocido como respuesta al daño del ADN (DDR) que comprende, entre otros: Caffeine, Wortmannin, KU-55933, KU-60019, KU-559403, Schisandrin B, NU6027, NVP BE2235, (como se describe en (Begg et al., 2011; Kelley et al., 2014; Weber y Ryan, 2015), todas las referencias se incorporan por referencia).

5 Un inhibidor de la HR es cualquier método compuesto o experimental capaz de dañar o inhibir el proceso celular conocido como reparación del ADN por recombinación homóloga (HR) que comprende, entre otros, a: Iniparib (SAR240550, BSI-201; Sanofi-Aventis), Olaparib (AZD2281, KU-0069436; AstraZeneca), Niraparib (Tesaró), Rucaparib (CO-338, AG-014699, PF-01367338; Pfizer), Veliparib (ABT-888; Abbott), AZD2461 (AstraZeneca), BMN673 (BioMarin Pharmaceutical), CEP-9722 (Cephalon), E7016 (Esai), INO-1001 (Inotek Pharmaceuticals), MK-10
10 4827 (Merck), Metoxiamina (Sigma Aldrich), RI-1, IBR2, B02, Halenaquinona (descrito en (Feng et al., 2015; Kelley et al., 2014; Ward et al., 2015), todas las referencias se incorporan por referencia).

Una molécula que se dirige específicamente y/o causa la generación de un daño en el ADN en los telómeros es cualquier enfoque compuesto o experimental que interactúa específica o preferencialmente con los telómeros, induciendo daños en el ADN dentro del ADN telomérico y/o la activación o inhibición de la señalización DDR y/o
15 reparación del ADN, pero no limitado a: ligandos de unión cuádruplex G (p. ej. BRACO-19, Telomestatin, RHPS4, Quarfloxin, TMPyP4, AS1410), inhibidores de la topoisomerasa, cisplatino, hidroxurea, (como se describe en (Lu et al., 2013; Muller y Rodríguez, 2014; Neidle, 2010; Salvati et al., 2015; Sissi y Palumbo, 2014), todas las referencias se incorporan por referencia).

Otras moléculas que se pueden usar en combinación con los oligonucleótidos son: Abitrexato (inyección de metotrexato), Abraxano (inyección de Paclitaxel), Adcetris (inyección de Brentuximab Vedotina), Adriamicina (Doxorrubicina), inyección de adrucilo (5-FU (Fluorouracilo)), Afinitor (Everolimus), Afinitor Disperz (Everolimus), Alimta (PEMETREXED), Inyección de Alkeran (Inyección de Melphalan), Tabletas de Alkeran (Melphalan), Aredia (Pamidronato), Arimidex (Anastrozol), Aromasin (Exemestano), Arranon (Nelarabina), Arzerra (Inyección de Ofatumumab), Avastina (Bevacizumab), Bexxar (Tositumomab), BiCNU (Carmustina), Blenoxano (Bleomicina),
20 Bosulif (Bosutinib), Inyección de Busulfex (Inyección de Busulfano), Campath (Alemtuzumab), Camptosar (Irinotecano), Caprelsa (Vandetanib), Casodex (Bicalutamida), CeeNU (Lomustina), Paquete de dosis de CeeNU (Lomustina), Cerubidina (Daunorubicina), Clolar (Inyección de Clofarabina), Cometriq (Cabozantinib), Cosmegen (Dactinomicina), CytosarU (Citarabina), Cytosan (Citoxano), inyección de Citoxano (inyección de Ciclofosfamida), Dacogen (Decitabina), DaunoXome (inyección de complejo lipídico de Daunorubicina), Decadron (Dexametasona),
30 DepoCyt, (inyección de complejo lipídico de Citarabina), Dexametasona Intensol (Dexametasona), Dexpak Taperpak (Dexametasona), Docefrez (Docetaxel), Doxil (Inyección de complejo lipídico de Doxorubicina), Droxia (Hidroxurea), DTIC (Decarbazina), Eligard (Leuprolida), Ellence (Ellence (epirubicina)), Eloxatina (Eloxatina (oxaliplatino)), Elspar (Asparaginasa), Emcit (Estramustina), Erbitux (Cetuximab), Erivedge (Vismodegib), Erwinaza (Asparaginasa Erwinia crisantemi), Etiol (Amifostina), Etopofos (Inyección de Etopósido), Eulexina (Flutamida), Fareston (Toremifeno),
35 Faslodex (Fulvestrant), Femara (Letrozol), Firmagon (Inyección de Degarelix), Fludara (Fludarabina), Folex (Inyección de Metotrexato), Folutina (Inyección de Pralatrexato), FUDR (FUDR (floxuridina)), Gemzar (Gemcitabina), Gilotrif (Afatinib), Gleevec (Mesilato de Imatinib), Gliadel Wafer (Carmustine wafer), Halaven (Inyección de Eribulin), Herceptina (Trastuzumab), Hexaleno (Altretamina), Hicamtin (Topotecano), Hicamtin (Topotecano), Hidrea (Hidroxurea), Iclusig (Ponatinib), Idamicina PFS (Idarubicina), Ifex (Ifosfamida), Inlita (Axitinib), Intron A alfab (Interferón alfa-2a), Iressa (Gefitinib), Istodax (Inyección de Romidepsina), Ixempra (Inyección de Ixabepilona), Jakafi (Ruxolitinib), Jevtana (Inyección de Cabazitaxel), Kadcila (Ado-trastuzumab Emtansina), Kiprolis (Carfilzomib),
40 Leukeran (Chlorambucilo), Leukina (Sargramostim), Leustatina (Cladribina), Lupron (Leuprolida), Lupron Depot (Leuprolida), Lupron DepotPED (Leuprolida), Lisodren (Mitotano), Kit de Marqibo (complejo lipídico de inyección de Vincristina), Matulano (Procarbazona), Megace (Megestrol), Mekinist (Trametinib), Mesnex (Mesna), Mesnex (Inyección de Mesna), Metastron (Cloruro de Strontium-89), Mexato (Inyección de Metotrexato), Mustargeno (Mecloretamina), Mutamicina (Mitomicina), Milerano (Busulfano), Milotarg (Gemtuzumab Ozogamicina), Navelbina (Vinorelbina), Inyección de Neosar (Inyección de Ciclofosfamida), Neulasta (filgrastima), Neulasta (pegfilgrastima), Neupogeno (filgrastima), Nexavar (Sorafenib), Nilandron (Nilandron (nilutamida)), Nipent (Pentostatina), Nolvadex (Tamoxifeno), Novantrona (Mitoxantrona), Oncaspar (Pegaspargasa), Oncovin (Vincristina), Ontak (Denileukin Diftitox), Onxol (Inyección de Paclitaxel), Panretina (Alitretinoína), Paraplatina (Carboplatino), Perjeta (Inyección de Pertuzumab), Platinol (Cisplatino), Platinol (Inyección de Cisplatino), PlatinolAQ (Cisplatino), PlatinolAQ (Inyección de Cisplatino), Pomalist (Pomalidomida), Prednisona Intensol (Prednisona), Proleuquina (Aldesleuquina), Purinetol (Mercaptopurina), Reclast (Ácido Zoledrónico), Revlimid (Lenalidomida), Reumatex (Metotrexato), Rituxan (Rituximab), RoferonA alfaa (Interferón alfa-2a), Rubex (Doxorubicina), Sandostatina (Octreotida), Sandostatina LAR Depot (Octreotida), Soltamox (Tamoxifeno), Spricel (Dasatinib), Sterapred (Prednisona), Sterapred DS (Prednisona),
55 Stivarga (Regorafenib), Supprelin LA (Implante de Histrelina), Sutent (Sunitinib), Silatron (Inyección de Peginterferón Alfa-2b (Silatrón)), Sinribo (Inyección de Omacetaxina), Tabloid (Tioguanina), Taflinar (Dabrafenib), Tarceva (Erlotinib), Cápsulas de Targretina (Bexaroteno), Tasigna (Decarbazona), Taxol (Inyección de Paclitaxel), Taxotero (Docetaxel), Temodar (Temozolomida), Temodar (Inyección de Temozolomida), Tepadina (Tiotepa), Talomida (Talidomida), TeraCis BCG (BCG), Tioplex (Tiotepa), TICE BCG (BCG), Toposar (Inyección de Etopósido), Torisel (Temsitrolimus), Treanda (hidrocloruro de Bendamustina), Trelstar (Inyección de Triptorelina), Trexall (Metotrexato), Trisenox (tríoóxido de arsénico), Tikerb (lapatinib), Valstar (Valrubicina Intravesical), Vantas (Implante de Histrelina), Vectibix (Panitumumab), Velban (Vinblastina), Velcade (Bortezomib), Vepesid (Etoposido), Vepesid (Inyección de

5 Etoposido), Vesanoid (Tretinoína), Vidaza (Azacitidina), Vincasar PFS (Vincristina), Vincnex (Vincristina), Votrient (Pazopanib), Vumon (Teniposida), Wellcovorin IV (Inyección de Leucovorina), Xalkori (Crizotinib), Xeloda (Capecitabina), Xtandi (Enzalutamida), Yervoi (Inyección de Ipilimumab), Zaltrap (Inyección de Ziv-aflibercept), Zanosar (Estreptozocina), Zelboraf (Vemurafenib), Zevalina (Ibritumomab Tiuxetano), Zoladex (Goserelina), Zolanza (Vorinostat), Zometa (Ácido Zoledrónico), Zortress (Everolimus), Zitiga (Abiraterona), Nimotuzumab e inhibidores del punto de control immune, como nivolumab, pembrolizumab/MK-3475, pidilizumab y AMP-224 dirigidos a PD-1; y BMS-935559, MEDI4736, MPDL3280A y MSB0010718C dirigidos a PD-L1 y los dirigidos a CTLA-4, como el ipilimumab.

10 La radioterapia significa el uso de radiación, generalmente rayos X, para tratar enfermedades. Los rayos X se descubrieron en 1895 y, desde entonces, la radiación se ha utilizado en medicina para el diagnóstico y la investigación (rayos X) y su tratamiento (radioterapia). La radioterapia puede ser desde el exterior del cuerpo como radioterapia externa, utilizando rayos X, irradiación de cobalto, electrones y más. Raramente, otras partículas como los protones. También puede provenir del interior del cuerpo como radioterapia interna, que utiliza metales o líquidos radiactivos (isótopos) para tratar el cáncer.

15 Otros aspectos adicionales incluyen combinar los oligonucleótidos descritos en el presente documento con otras terapias contra el cáncer para obtener un beneficio sinérgico o aditivo.

20 Las terapias contra el cáncer existentes son tratamientos eficaces contra el cáncer que actúan dañando el ADN o inhibiendo la DDR de las células cancerosas. Sin embargo, la actividad dañina del ADN de la mayoría de ellos no es específica de secuencia. Los oligonucleótidos de la presente invención dañan la DDR de una manera específica de secuencia, luego pueden conferir especificidad de secuencia frente a tratamientos dañinos de ADN existentes, mejorando así la eficacia.

El programa de tratamiento con las combinaciones puede prever que el oligonucleótido se administre concomitantemente, antes y/o después de cualquiera de los agentes terapéuticos "asociados" identificados anteriormente.

25 Las terapias combinadas se pueden utilizar para las etapas avanzadas de la enfermedad, pero también, prospectivamente, en el entorno adyuvante y neoadyuvante.

En la presente invención, el "ADN telomérico disfuncional" es un ADN telomérico dañado y/o un ADN telomérico críticamente corto y/o un ADN telomérico no encapsulado y/o un ADN telomérico desprotegido y/o cualquier caso en que la señal DDR esté activa en un telómero.

30 Las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de un liposoma en el que el oligonucleótido o los oligonucleótidos de la presente invención se combinan, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas lamelares en solución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. Se pueden hacer composiciones farmacéuticas que contengan oligonucleótidos para usar en terapia antiproliferativa. La administración de tales composiciones farmacéuticas se puede llevar a cabo en una variedad de formas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, tales como la ingestión oral, la inhalación, por ejemplo, de un aerosol, aplicación tópica o transdérmica, o intracraneal, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal, intrauterina, oral, rectal o parenteral (p. ej., intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular), o inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral o intravenosa. La ruta de administración se puede determinar según el sitio del tumor, el crecimiento o la lesión que se trate. Para administrar una composición que comprenda una cantidad efectiva de uno o más oligonucleótidos al sitio de un crecimiento o tumor, se puede usar la inyección directa en el sitio. Alternativamente, para sitios accesibles a la mucosa, se puede usar la entrega balística recubriendo los oligonucleótidos en perlas de diámetro micrométrico, o mediante un dispositivo de inyección de proyección intraoral. Los vectores virales para la administración de ADN en terapia génica han sido objeto de investigación durante varios años. Los retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus vacunales y virus específicos de plantas pueden usarse como sistemas para empaquetar y administrar oligonucleótidos para el tratamiento del cáncer u otros crecimientos. Se han desarrollado vectores de virus adenoasociados que no pueden replicarse, pero que conservan la capacidad de infectar las células. Una ventaja es la baja inmunogenicidad que permite la administración repetida. Han sido revisados sistemas de administración, por ejemplo, en (Page y Cudmore, 2001). Los estudios realizados con oligonucleótidos sobre la teoría de su inhibición de la función de un ácido nucleico diana (oligonucleótidos antisentido), la mayoría de estos estudios realizados con oligonucleótidos de fosforotioato, han encontrado métodos efectivos de suministro a las células diana. Los oligonucleótidos antisentido en ensayos clínicos se han administrado en soluciones salinas sin vehículos de administración especiales (revisado en (Hogrefe, 1999)). Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con los fluidos del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones,

inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener, además de los oligonucleótidos de la presente invención, un vehículo isotónico como la inyección de cloruro de sodio, la inyección de Ringer, la inyección de dextrosa, la dextrosa y la inyección de cloruro de sodio, la inyección de Ringer lactato u otro vehículo como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la materia.

El uso de sistemas de liberación temporizada o de liberación sostenida también se incluye en la invención. Tales sistemas son altamente deseables en situaciones en las que la cirugía es difícil o imposible, p. ej., en pacientes debilitados por la edad o el curso de la enfermedad en sí, o cuando el análisis de riesgo-beneficio dicta el control respecto a la cura. Un método consiste en utilizar una bomba implantable para administrar dosis medidas de la formulación durante un período de tiempo, por ejemplo, en el sitio del tumor. Se puede usar una matriz de liberación sostenida como método de suministro de la composición farmacéutica que comprende oligonucleótidos, especialmente para el tratamiento local de un crecimiento o tumor. Es una matriz hecha de materiales, generalmente polímeros, que son degradables por hidrólisis enzimática o ácida/base o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la enzima y los fluidos corporales actúan sobre la matriz. La matriz de liberación sostenida se elige deseablemente entre materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), co-glicólido de polilactida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli (orto) ésteres, poliproteínas, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, polihidratos, aminoácidos como la fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de alguno de polilactida, poliglicólido o co-glicólido de polilactida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico). La cantidad de oligonucleótido de la presente invención en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección a tratar, y de la naturaleza de los tratamientos previos que el paciente haya experimentado. Para un paciente humano, el médico tratante decidirá la dosis de oligonucleótido de la presente invención con la que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico tratante puede administrar dosis bajas y observar la respuesta del paciente. Se pueden administrar dosis más grandes hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo para el paciente y, en ese punto, la dosis no se incrementa ya jamás. La duración de la terapia usando la composición farmacéutica de la presente invención variará dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar y la condición y la posible respuesta idiosincrásica de cada paciente individual.

La presente invención también proporciona un kit que comprende al menos un oligonucleótido como se definió anteriormente o una composición farmacéutica que lo comprenda. El kit puede contener instrucciones escritas. El oligonucleótido puede estar en un recipiente separado.

En la presente invención, el método para identificar a un sujeto a tratar con el oligonucleótido como se definió anteriormente o con la composición farmacéutica como se definió anteriormente puede comprender además comparar la cantidad medida de DDRNA o tDDRNA con una cantidad de control. La cantidad de control puede ser la cantidad medida en un sujeto sano, la cantidad de control puede ser la cantidad medida en un sujeto no afectado por una enfermedad ALT o no afectado por una afección no cancerosa asociada con la disfunción de los telómeros, la cantidad de control puede ser la cantidad medida en el mismo sujeto antes o después de la intervención terapéutica.

La invención se ilustrará por medio de ejemplos no limitativos con referencia a las siguientes figuras.

Figura 1. Esquema de las moléculas de DDRNA generadas en los telómeros y de los oligonucleótidos de LNA. Los DDRNA TeloG y TeloC se generan a partir de telómeros disfuncionales y son necesarios para la activación de DDR. Los oligonucleótidos antisentido (anti TeloG y anti TeloC) pueden unirse e inhibir la función de DDRNA, por lo que tienen una actividad terapéutica. Las secuencias mostradas son ejemplos no limitativos de la presente invención. Las secuencias informadas son un ejemplo de las posibles secuencias ASO.

Figura 2. Los DDRNA teloméricos se regulan de forma ascendente tras el destapado de los telómeros. Las especies de ARN de tamaño seleccionado (más cortas que 40 nucleótidos) se analizaron por RT-qPCR. MicroRNA mir29b se utilizó como normalizador (n = 4 experimentos independientes). TRF2^{+/-} y TRF2^{-/-} se refieren a células que tienen una delección heterocigótica u homocigótica de TRF2; TeloG y TeloC son DDRNA con cualquier secuencia de cadena telomérica, como se describe en la Figura 1.

Figura 3. Los DDRNA teloméricos están sobrerregulados en líneas celulares ALT. Se analizó ARN del tamaño seleccionado (más corto que 40 nucleótidos) por RT-qPCR para detectar los niveles de DDRNA. La línea celular WI-38 VA-13 ALT se comparó con su línea celular parental sin ALT (o ALT negativa), WI-38 (n = 3 experimentos independientes); la línea celular de telomerasa positiva (sin ALT o ALT negativa) SW39 se comparó con la línea celular ALT-positiva SW26 (n = 2 experimentos independientes). Se usó un oligonucleótido de ARN de máximo artificial como normalizador. TeloG y TeloC son DDRNA con cualquiera de las secuencias de cadenas teloméricas, como se describe en la Figura 1.

- Figura 4. El oligonucleótido de LNA con una secuencia telomérica reduce el crecimiento celular específicamente en células U-2 OS. Se transfectaron U-2 OS (ALT o ALT positivo), BJ ELR (sin ALT o ALT negativo) y células BJ hTERT (sin ALT o ALT negativo) los días 0, 3 y 7 con el LNA indicado (simulación, control, anti TeloG o anti TeloC) a una concentración de 200 nM. Los gráficos muestran el número relativo de células normalizadas en el día 0 (n = 3 experimentos independientes; * = valor de p <0,05, ** = valor de p <0,01).
- Figura 5. Un oligonucleótido de LNA con una secuencia telomérica reduce el número de cuerpos de PML asociados a ALT (APB) en U-2 OS. Las células U-2 OS se transfectaron con el LNA indicado a una concentración final de 200 nM y se tiñeron para APB el día 3 después de la transfección (n = 3 experimentos independientes; ** = valor de p <0,001).
- Figura 6. Un oligonucleótido de LNA con una secuencia telomérica reduce el crecimiento celular en diferentes líneas celulares de ALT. Se transfectaron células U-2 OS, Saos-2 y WI-38 VA-13 el día 0, 3 y 7 con el LNA indicado a una concentración final de 200 nM. Los gráficos muestran el número relativo de células en el día 10, normalizado en el día 0.
- Figura 7. El oligonucleótido de LNA del esqueleto de fosforotioato (PSLNA) con una secuencia telomérica es 10 veces más efectivo para inhibir el crecimiento celular y retener la especificidad para las células ALT. Las células U-2 OS y BJ hTERT se transfectaron en los días 0, 3 y 7 con el PS LNA indicado a las concentraciones indicadas. Los gráficos muestran el número relativo de células el día 10, normalizado el día 0.
- Figura 8. El oligonucleótido de LNA de esqueleto de fosforotioato (PSLNA) con una secuencia telomérica es eficaz para inhibir el crecimiento celular específicamente en células U-2 OS.
- Se transfectaron células U-2 OS y BJ hTERT en los días 0, 3 y 7 con el PS LNA indicado a una concentración de 20 nM. Los gráficos muestran el número relativo de células el día 10, normalizado el día 0.
- Figura 9. Esquema de las moléculas de DDRNA generadas en los telómeros y de los oligonucleótidos diminutos de LNA. Las moléculas diminutas de LNA pueden unirse e inhibir los DDRNA TeloG y TeloC, por lo que tienen una actividad terapéutica. Las secuencias mostradas son ejemplos no limitativos de la presente invención.
- Figura 10. El oligonucleótido diminuto anti TeloC LNA es eficaz para inhibir el crecimiento celular en células U-2 OS. Las células U-2 OS se transfectaron los días 0, 3 y 7 con el LNA de fosforotioato indicado a una concentración final de 20 nM. El gráfico muestra el crecimiento relativo de la célula, medido por el método de resazurina (ver Materiales y métodos), normalizado el día 0 (n = 3 experimentos independientes; *** = valor de p <0,001).
- Figura 11. El oligonucleótido de LNA anti TeloC diminuto es eficaz para inhibir el crecimiento celular específicamente en células U-2 OS. Las células U-2 OS y BJ se transfectaron los días 0, 3 y 7 con el LNA indicado a una concentración de 20 nM. Los gráficos muestran el crecimiento celular relativo medido por el método de resazurina, normalizado el día 0.
- Figura 12. Cuando se usa a una concentración 3 veces mayor, el oligonucleótido anti TeloC LNA diminuto muestra una eficacia similar respecto al oligonucleótido PS anti TeloC LNA para inhibir el crecimiento celular en células U-2 OS. Las células U-2 OS se transfectaron el día 0 con el LNA de fosforotioato indicado a una concentración de 20 nM (PS anti TeloC) o 60 nM (control diminuto, anti TeloG diminuto, anti TeloC diminuto). El gráfico muestra el crecimiento celular relativo el día 6, medido por el método de resazurina, el día 6 normalizado el día 0.
- Figura 13. A una concentración 3 veces mayor, el oligonucleótido anti TeloC LNA diminuto es específico para las células U-2 OS. Las células U-2 OS y BJ se transfectaron el día 0 con el LNA de fosforotioato indicado a una concentración de 60 nM (control diminuto, anti TeloG diminuto, anti TeloC diminuto) o 20 nM (PS anti TeloC). Los gráficos muestran el crecimiento celular relativo medido por el método de resazurina, normalizado el día 0.
- Figura 14. Las células GBM14 son sensibles al oligonucleótido de PS anti TeloC LNA suministrado desnudo de una manera dependiente de la concentración. GBM14 se incubó con 10 o 40 μ M del PS LNA indicado en el medio de cultivo celular. Los gráficos muestran el crecimiento celular relativo medido por el método de resazurina, normalizado el día 0.
- Figura 15. Las células GBM14 son sensibles al oligonucleótido anti TeloC LNA diminuto suministrado desnudo. Se incubó GBM14 con 120 μ M del LNA diminuto indicado en el medio de cultivo celular. El gráfico muestra el crecimiento celular relativo medido por el método de resazurina, normalizado el día 0.
- Figura 16. El crecimiento tumoral de G292 in vivo se reduce con el tratamiento con PS anti TeloC y anti TeloC diminuto. Se trataron ratones con tumores G292 con inyección intraperitoneal del oligonucleótido o PBS indicado como control. (n = 7 ratones por grupo; ** valor de p <0,01).
- Figura 17. Los tumores G292 alcanzaron el tamaño de 1 cm³ más lentamente cuando se trataron con PS anti TeloC. (n = 7 ratones por grupo; ** = valor p <0,01; *** = valor p <0,001).

- 5 Figura 18. El pez cebra mutante de telomerasa de segunda generación tratado con PS anti TeloC o anti TeloG muestra un fenotipo menos grave. El pez cebra mutante de telomerasa se inyectó con el PS LNA y se cruzó para obtener una segunda generación. Los gráficos muestran el porcentaje de peces de segunda generación que muestran diferentes grados de gravedad del defecto morfológico asociado con la mutación de la telomerasa (se analizaron al menos 200 peces por muestra).
- Figura 19. El pez cebra mutante de telomerasa de segunda generación tratado con PS anti TeloC o anti TeloG sobrevive más tiempo. El gráfico muestra la tasa de supervivencia del pez cebra mutante de telomerasa de segunda generación (se analizaron al menos 200 peces por muestra).
- 10 Figura 20. PS anti TeloG y anti TeloC previene el crecimiento celular en las células que expresan progerina. Las células BJ infectadas con retrovirus que expresaban Lamin A o Progerin se transfectaron con el PS LNA indicado (20 nM). Las células se fijaron y se tiñeron después de un pulso de BrdU de 8 horas para analizar la inmunofluorescencia. Los anticuerpos contra BrdU y Ki67 se usaron para la cuantificación.
- 15 Figura 21. La progerina se expresa a niveles similares en muestras tratadas con PS LNA. Las células BJ infectadas con retrovirus que expresaban Lamin A o Progerina se probaron para detectar la Lamin (que detecta tanto la isoforma A como la C), la expresión de progerina y vinculina como control de carga.
- Figura 22. PS anti TeloG aumenta las tasas de supervivencia en un modelo de ratón de expresión de progerina en la piel. El gráfico muestra la tasa de supervivencia de ratones HGPS (que expresan progerina) y naturales tratados con oligonucleótido PS anti TeloG LNA en comparación con ratones no tratados (n representa el número de ratones analizados por cada grupo).
- 20 Figura 23. Detección de transcripciones precursoras teloméricas. (a) Se aisló ARN de células totales a partir de MEF (fibroblastos embrionarios de ratón) del genotipo indicado y se usó para RT-qPCR específica de cadena para detectar transcripciones de precursores teloméricos. (b) Se usó la misma RT-qPCR que en (a) para detectar las transcripciones precursoras teloméricas de fibroblastos humanos. El ARN total de células se aisló de SW39 (sin ALT) y SW26 (ALT) para el panel derecho.
- 25 Figura 24. Activación de las vías de apoptosis en células ALT tras el tratamiento anti TeloC.
- Las células U-2 OS se trataron con los LNA indicados. Los PS LNA se transfectaron a 20 nM, mientras que los LNA diminutos se transfectaron a 60 nM. Las células se transfectaron los días 0, 3 y 7. Las muestras se recolectaron en los días indicados para la detección de proteínas de marcadores de apoptosis, escisiones de Caspasa 3 y Parp-1, o para el análisis FACS (fracción Sub G1 y escisión de caspasa 3).
- 30 Figura 25. Anti TeloC LNA induce una fase S alargada en las células ALT. Las células U-2 OS se transfectaron con los LNA indicados, PS LNA a 20 nM y LNA diminuto a 60 nM los días 0, 3 y 7. Las células se recuperaron los días 2, 6 y 9 para el análisis FACS del ciclo celular.
- Figura 26. Anti TeloC LNA es un inhibidor específico de ALT. Las líneas celulares se transfectaron con los LNA indicados, PS LNA a 20 nM y LNA diminuto a 60 nM, los días 0, 3 y 7. Los gráficos muestran el número relativo de células medido por los valores de resazurina normalizados al día 0.
- 35 Figura 27. El suministro desnudo de LNA es suficiente para inhibir el crecimiento de células U-2 OS. (A) Las células U-2 OS se trataron con LNA a las concentraciones indicadas el día 0. Los gráficos muestran el número relativo de células el día 7 medido por los valores de resazurina normalizados al día 0. (B) Las células U 2 OS se trataron como en (A), mientras que el número de células se midió el día 6.
- 40 Figura 28. El crecimiento de G-292 es inhibido por el LNA anti TeloC. G-292 se transfectó con los LNA indicados a 200 nM los días 0 y 3. El gráfico muestra el número relativo de células medido por los valores de resazurina normalizados el día 0.
- Figura 29. El suministro desnudo de LNA es suficiente para inhibir el crecimiento de células G-292. Las células G-292 se trataron con LNA a las concentraciones indicadas el día 0. El gráfico muestra el número relativo de células el día 7 medido por los valores de resazurina normalizados al día 0.
- 45 Figura 30. 2'-o-methyl (2'-O-Me) ASO anti TeloC ASO es eficaz para inhibir el crecimiento celular específicamente en las células U-2 OS. Las células U-2 OS y BJ se transfectaron el día 0 con el 2'-O-Me ASO o PS anti TeloC indicado a una concentración de 20 nM. Los gráficos muestran el número relativo de células medido por los valores de resazurina normalizados al día 0.
- 50 Figura 31. 2'-O-Me ASO no son tóxicos hasta 100 nM. Las células U-2 OS se transfectaron el día 0 con los ASO indicados a la concentración indicada. Los gráficos muestran el número relativo de células medido por los valores de resazurina normalizados al día 0.

Descripción detallada de la invención

Materiales y métodos

Células cultivadas: MEFs CRE-ER TRF2^{fl/fl} y MEFs CRE-ER TRF2^{fl/+} (Celli y de Lange, 2005) se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y glutamina al 1%; para la activación de CRE y la inducción de eliminación de TRF2, las células se trataron con 600 nM de 4-hidroxitamoxifeno durante 24 horas y se analizaron 24 horas más tarde. Las células U-2 OS (ATCC) se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y glutamina al 1%. Se cultivaron células Saos-2 (ATCC) en Glutamax 5A + de McCoy suplementado con suero bovino fetal al 15%. WI-38 y WI-38 VA-13 (ATCC) se cultivaron en MEM + Glutamax suplementado con suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales 10 mM y piruvato sódico 1 mM. La línea celular positiva a la telomerasa SW39 (ALT negativa) y la línea celular positiva ALT SW26 (Bechter et al., 2003) se cultivaron en una mezcla 4:1 de medio modificado por Dulbecco Eagle-medio 199 suplementado con 10% de suero de ternera bovina suplementado definido. Se obtuvo BJ hTERT por infección retroviral de células BJ (ATCC) con un plásmido que expresaba la telomerasa humana, y se cultivó en MEM + Glutamax suplementado con suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales 10 mM y piruvato sódico 1 mM. BJ ELR (Hahn et al., 1999) se cultivó en DMEM:M199 4:1 suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina al 1%, piruvato de sodio 1 mM y HEPES 25 mM. GBM14 (ALT positivo) se cultivaron en DMEM/F12 con GlutaMAX suplementado con 2% de B27, 5 µg/ml de heparina, 20 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de EGF. Se cultivó G-292 (ATCC) en Glutamax + McCoy 5A suplementado con suero bovino fetal al 10% y glutamina al 1%.

Transfección: LNA se hirvió a 90 °C durante 5 minutos y se enfrió en hielo durante 5 minutos antes de la transfección con Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante a la concentración final indicada. Las células transfectadas de forma simulada se trataron solo con RNAiMAX.

Curvas de crecimiento: en cada punto de tiempo indicado, las células se contaron por triplicado con un contador Coulter (Beckman) o con el kit de ensayo de toxicología in vitro, basado en resazurina (Sigma), que permite una medición espectrofotométrica de la actividad metabólica de las células vivas según las instrucciones del fabricante.

Inmunofluorescencia: las células se fijaron con una solución 1:1 de metanol/acetona durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo, las células se tiñeron con anticuerpo primario anti PML (Santa Cruz) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios anti ratón conjugados durante 40 minutos a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1 µg/ml). Las secciones confocales se obtuvieron con un microscopio láser confocal Leica TCS SP2 AOBS mediante la adquisición de secciones z ópticas a diferentes niveles a lo largo del eje óptico y el software CellProfiler contó el número de APB por célula.

Aislamiento de ARN: El ARN celular total se extrajo usando el kit de aislamiento miRNA de mirVana® (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante.

qPCR de ARN pequeño: la síntesis de ADNc y la RT-PCR se realizaron utilizando el sistema miScript PCR (Qiagen). El ARN se fraccionó pasando 5 µg de ARN total sobre un gel desnaturalizante de poliacrilamida. Se extrajeron en gel especies de ARN de menos de 40 nucleótidos y se sintetizó ADNc usando el kit miScript II RT con tampón HiSpec. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 60 minutos seguido de una etapa de inactivación por calor durante 5 minutos a 95 °C. El ADNc se analizó utilizando miScript SYBR Green PCR Master Mix, miScript Universal Primer, cebador mir29b (TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT) SEQ ID No. 7, cebador Spike-In (CGAATTCCACAAATTGTTATCC) SEQ ID No. 8 para monitorear la eficiencia de la extracción del ARN del gel y los cebadores que contienen la secuencia de telómeros (TAGGGTTAGGGTTAGGGT, SEQ ID N° 9, CCCTAACCCCTAACCCCTAA SEQ ID N° 10).

qPCR específico de cadena: se usó ARN total procedente del kit de aislamiento de miARN mirVana®. Las muestras se trataron con DNasa I (Thermo Scientific) para eliminar cualquier posible contaminación residual del ADN genómico. Se transcribieron inversamente 1000 ng de ARN total usando el kit de síntesis de ADNc Superscript First Strand (Invitrogen) con cebadores específicos de cadena. Cebadores para la transcripción inversa utilizados: RPP0rev para la detección del ARNm Rplp0 de mantenimiento; teloCrev para la detección del precursor telomérico de cadena rica en G; teloGrev para la detección de precursor telomérico de cadena rica en C.

RT-qPCR se realizó utilizando Roche SYBR green. Para cada reacción de RT-qPCR, se usaron 50 ng de ADNc. Para amplificar las repeticiones teloméricas, los inventores adaptaron una técnica descrita en (Cawthon, 2002), que permite la generación de un producto de amplificación de longitud fija. Cebadores para qPCR utilizados: RPP0fwd y RPP0rev para la detección del ARNm de Rplp0 de mantenimiento; teloF y teloR para la detección de precursores teloméricos.

A continuación, la lista de cebadores (orientación 5'-3') utilizados para RT-qPCR específico de cadena:

RPP0fwd: TTCATTGTGGGAGCAGAC (SEQ ID No. 11)
 RPP0rev: CAGCAGTTTCTCCAGAGC (SEQ ID No. 12)

ES 2 781 459 T3

teloCrev: CCCTAACCTAACCTAA (SEQ ID No. 13)

teloGrev: TAGGGTTAGGGTTAGGGT (SEQ ID No. 14)

teloF: CGGTTTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGG TTTGGGTT (SEQ ID No. 15)

teloR: GGCTTGCCCTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCT (SEQ ID No. 16)

5 Secuencias reconocidas de ARN pequeño. Dos enzimas se ligaron a los dos extremos de las moléculas de ARN en la muestra a analizar. El extremo 3' del ARN de partida se ligó a un enlazador de ADN monoadenilado mediante una enzima truncada de ARN ligasa 2 (NEB) T4 incubada durante 1 hora a 25 °C. El enlazador de ARN 5' se ligó luego mediante una T4 ARN ligasa 1 (NEB) al ARN diana a 20 °C durante 1 hora, después de eliminar la estructura del final 5' por pirofosfatasa ácida de tabaco (epicentro), incubado a 37 °C durante 1 hora. Los enlazadores permitieron la síntesis de ADNc usando el kit PrimeScript RT-PCR (Takara). La reacción de la transcripción inversa se incubó a 44 °C durante 1 hora. La posterior amplificación por PCR usando Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) se llevó a cabo de la siguiente manera: 98 °C 2 minutos; 22 ciclos de: 98 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos; 72 °C por 5 minutos; mantenido a 4 °C. Para capturar las dianas de ADNc amplificadas, se usaron cebos de ARN complementarios que contenían nucleótidos marcados con biotina. Estos cebos de ARN se produjeron utilizando el kit de transcripción in vitro Ambion MAXIscript T7 (Life Technologies) y la mezcla de etiquetado de ARN de biotina (Roche). Se incubó un ADNds que contenía el promotor T7 a 37 °C durante 1 hora para permitir la transcripción in vitro. Los cebos de ARN y las dianas de ADNc se incubaron a 37 °C durante 48 horas en presencia de un inhibidor de SUPERasa (Life Technologies) y de los siguientes agentes bloqueantes: Cot-1 humano (Life Technologies), solución de ADN de esperma de salmón UltraPure® (Thermo Scientific) y un bloque personalizado de 200 µM. Las moléculas híbridas de ARN-ADNc fueron capturadas por cuentas de Streptavidina C1 Dynabeads® MyOne™ (Life Technologies), mientras que los ADNc dirigidos no fueron eliminados. Los ADNc capturados se codificaron con un código de barras mediante PCR con los cebadores de la PCR Script Index (Illumina) y se secuenciaron mediante un secuenciador MiSeq (Illumina). Las secuencias de oligonucleótidos (orientación 5'-3') fueron:

25 enlazador 3' DNA AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-Amina (SEQ ID No. 17)

enlazador 5' RNA ACACUCUUUCCCUACACGACGCUCUUCGAUCU (SEQ ID No. 18)

cebador RT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT (SEQ ID No. 29)

PCR directa AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT (SEQ ID No. 30)

30 PCR inversa CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT (SEQ ID No. 31)

Bloque directo AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT (SEQ ID No. 32)

35 Bloque inverso CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT (SEQ ID No. 33)

40 Transferencia Western: Las células se recogieron en tampón de lisis TEB150 (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 5 mM, Tritón al 0,5%, glicerina al 10%) y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido hasta la preparación de la muestra para la transferencia Western. Para lisar, las células se descongelaron en hielo, se centrifugaron durante 15 minutos a + 4 °C y 13200 RPM. El sobrenadante que contenía la proteína se guardó y los restos celulares se destruyeron. Las proteínas se cuantificaron utilizando el ensayo de Bradford. Después de la transferencia, las membranas se probaron con un anticuerpo anti-caspasa-3 (Cell Signaling 9661), un anticuerpo anti PARP (Serotec) y un anticuerpo anti-tubulina (Millipore). Para Lamin A/C, Progerina y Tubulina, las células se recogieron en tampón Laemmli 1x y se almacenaron a -80 °C. Para lisar, las células se pasaron a través de una jeringa y se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos. Las proteínas se cuantificaron utilizando el ensayo de Lowry. Después de la transferencia, se probaron las membranas con anticuerpo anti Lamin (Santa Cruz Biotech sc-6215), reconociendo las isoformas A y C de Lamin, y el anticuerpo Progerina y anti-Tubulina (Millipore).

50 Análisis FACS: para el análisis del ciclo celular, el sobrenadante medio se guardó y se centrifugó con células de tripsina, se fijó en etanol al 75% y se tiñó con yodo de propidio (PI, Sigma, 50 µg/ml) y solución de RNasa A (Sigma, 250 µg/ml) en 1X PBS. Para el análisis de escisión de caspasa-3 por FACS, el sobrenadante medio se guardó y se centrifugó con células tripsinizadas, se fijó en formamida al 1% en hielo durante 20 minutos, se almacenó en etanol al 75%, se tiñó con anticuerpo Caspasa-3 (Cell Signaling 9661) y, posteriormente, se conjugó con el fluoróforo FITC (anti conejo FITC, ImmunoJackson), y se tiñó con una solución de PI/RNasa A. Las muestras se analizaron en un BD FACS Cantoll, utilizando un láser de 488 nm y un filtro 530/30 para FITC, y un láser de 670 nm y un filtro 585/42 para PI. La adquisición se realizó con el software BDFACS DIVA v6.1.1, y el análisis se realizó con el software

ModfitLT3.0. Para las células Sub G-1 y caspasa positivas, se analizaron al menos 500 eventos por muestra. Para el ciclo celular, se analizaron al menos 8000 eventos por muestra.

5 Suministro desnudo: los oligonucleótidos en PBS se agregaron directamente a las células en placa, mientras que las células tratadas de manera simulada solo recibieron PBS. Se usó una cantidad constante de PBS por condición en cada experimento.

Infección retroviral: las células BJ se transdujeron con un vector retroviral que expresaba LaminA de tipo salvaje o el gen Progerina mutante y se seleccionaron con puromicina.

10 Tratamiento in vivo de los xenoinjertos G292: ratones machos desnudos CD-1, de Charles River Italia, se mantuvieron en jaulas utilizando lecho sometido a autoclave a vapor (estéril), dieta radiada con rayos γ y agua mineral acidificada.

15 Se inyectaron 10×10^6 células G-292 por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones machos desnudos el día 0. Los animales fueron examinados regularmente para detectar la posible aparición de tumores. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 90 a 220 mm³, los ratones se asignaron al azar y a grupos de tratamiento con un objetivo de 7 ratones por grupo. Cuando comenzaba el tratamiento, el volumen tumoral medio era de aproximadamente 0,14 cm³. Los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 15 mg/kg los días 13, 17, 21, 25 para PBS y anti TeloC diminuto, los días 13 y 17 para PS anti TeloC.

Todos los procedimientos adoptados para el alojamiento y manipulación de animales cumplían estrictamente con las directrices italianas y europeas para el bienestar de los animales de laboratorio. Peso corporal el día del implante tumoral: 25 -38 g.

20 Tratamiento in vivo del pez cebra mutante Tert: se atravesó el pez cebra mutante telomerasa heterocigoto (Tert +/-, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2762901/>) y se inyectaron los huevos en una etapa celular con 0,5 ng/ μ l de PS LNA en la yema. Los peces inyectados se criaron hasta la edad adulta en el vivero y luego se genotiparon con clips de aletas para identificar a los peces mutantes homocigotos (Generación 1 terc -/-), que fueron cruzados y analizada su descendencia (Generación 2) para determinar la tasa de supervivencia y el fenotipo.

25 Tratamiento in vivo de ratones HGPS: los ratones HGPS que expresan la progerina en los queratinocitos epidérmicos (McKenna et al, Aging cell 2014) fueron inyectados intraperitonealmente con los oligonucleótidos PS LNA a una concentración de 15 mg/Kg cada 3-4 días a partir del día embrionario 17.5.

Oligonucleótidos antisentido:

Secuencias de LNA: Exiqon produjo los oligonucleótidos de LNA.

30 LNA con un esqueleto de fosfato (Figs. 4, 5, 6):

Control ACTGATAGGGAGTGGTAAACT (SEQ ID No. 19)

Anti TeloG CCCTAACCCCTAACCC (SEQ ID No. 20)

Anti TeloC GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (SEQ ID No. 21)

35 LNA con un esqueleto de fosforioato completo (LNA-PS), Fig. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31):

(* significa modificación de fosforioato)

PS Control A*C*T*G*A*T*A*G*G*A*G*T*G*G*T*A*A*A*C*T (SEQ ID No. 19)

PS Anti TeloG C*C*C*T*A*A*C*C*C*T*A*A*C*C*C*T*A*A*C*C*C (SEQ ID No. 20)

PS Anti TeloC G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G (SEQ ID No. 21)

40 LNA Diminuto (8-mer) con una cadena principal totalmente fosforioato (Figs. 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 24, 25, 26, 27, 28, 29):

Control Diminuto C*G*T*C*A*T*A*C (SEQ ID No. 22)

Anti TeloG Diminuto C*C*C*T*A*A*C*C (nt 1 a 8 de SEQ ID No. 20)

Anti TeloC Diminuto G*G*G*T*T*A*G*G (nt 1 a 8 de SEQ ID No. 21)

45 2'-o-metil oligonucleótidos (Figs. 30, 31): Los oligonucleótidos de 2'-o-metilo fueron producidos por Integrated DNA Technologies.

(* significa modificación del fosforotioato; m significa modificación del grupo metilo en la posición 2')

Control 2'-O-Me: mU*mU*mA*mU*mC*mC*mG*mC*mU*mC*mA*mC*mA*mA*mU*mU*mC*mC*mA*mC*m A*mU
(SEQ ID No. 34)

5 2'-O-Me Anti TeloG: mC*mC*mC*mT*mA*mA*mC*mC*mC*mT*mA*mA*mC*mC*mC*mT*mA*mA*mC*mC*mC (SEQ ID No. 20)

2'-O-Me Anti TeloC: mG*mG*mG*mT*mT*mA*mG*mG*mG*mT*mT*mA*mG*mG*mG*mT*mT*mA*mG*mG*mG
(SEQ ID No. 21)

10 Análisis estadístico: los resultados se muestran como media más o menos desviación estándar o error estándar de la media. El valor de P se calculó mediante la prueba t de dos colas de Student, la prueba de Chi cuadrado, la prueba de Mann Whitney o la prueba de Mantel-Cox, según corresponda.

Resultados

15 Los inventores midieron los niveles de DDRNA generados en los telómeros dañados por qPCR. Para hacerlo, utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en los que los telómeros pueden desprotegerse eliminando la proteína de unión a telómeros TRF2 (Celli y de Lange, 2005). Esto conduce a la activación de DDR en prácticamente todos los telómeros. Este es un modelo aceptado de disfunción telomérica. Ya se ha demostrado que, cuando el ADN está dañado, se generan pequeñas moléculas de ARN llamadas DDRNA en ese locus dañado específico, y que llevan la misma secuencia del ADN dañado (Francia et al., 2012); así, los inventores razonaron que se podrían generar dos conjuntos diferentes de moléculas de DDRNA tras la desprotección de los telómeros, un conjunto derivado de la transcripción de la cadena de ADN telomérico rico en G (DDRNA de TeloC) y un conjunto derivado de la transcripción de la cadena de ADN telomérico rico en C (TeloG DDRNA; Figura 1). Mediante RT-qPCR y mediante secuenciación dirigida de ARN pequeño, se pudo detectar un aumento reproducible de dos a tres veces de DDRNA TeloC y TeloG en células con telómeros desprotegidos, en comparación con las células de control con telómeros normales (Figura 2).

25 En células con telómeros desprotegidos, tanto los transcritos precursores de DDRNA de TeloG como de TeloC se indujeron fuertemente en comparación con las células de control (Figura 23a), lo que indica que la desprotección de los telómeros induce la transcripción en los telómeros.

30 Las células ALT positivas muestran una fuerte activación crónica de DDR en los telómeros (Cesare y Reddel, 2010). Los inventores descubrieron que esto se correlaciona con niveles más altos de tDDRNA, detectados por RT-qPCR, en el AL-positivo WI-38 VA-13, en comparación con su línea celular parental, fibroblastos humanos WI-38 y en el SW26 ALT-positivo en comparación con los fibroblastos de pulmón fetal SW39 telomerasa positivos, que son líneas celulares inmortalizadas de la misma línea celular de fibroblastos, IMR90, que dan como resultado diferentes mecanismos de mantenimiento de los telómeros (Bechter et al., 2003) (Figura 3). Además, las transcripciones precursoras de TeloG y TeloC DDRNA también estaban fuertemente reguladas al alza en células SW26 ALT positivas en comparación con las células SW39 de control (Fig. 23b).

35 Las células ALT positivas dependen del mecanismo de recombinación homóloga para mantener sus telómeros (Cesare y Reddel, 2010); así, los inventores probaron si son hipersensibles a la inhibición de DDRNA.

40 Los inventores transfectaron una línea celular ALT, células de osteosarcoma humano U-2 OS, con moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA) (Veedu y Wengel, 2010) dirigidas a las transcripciones teloméricas ricas G o C (anti TeloG y anti TeloC, respectivamente), o un LNA de control, y los inventores monitorearon el crecimiento celular durante diez días. El crecimiento de las células transfectadas con el control y el LNA anti TeloG no difirió de las células tratadas de forma simulada; de manera diferente, el LNA anti TeloC perjudicó significativamente el crecimiento del U-2 OS (Figura 4).

45 El efecto es específico para las células ALT, ya que el LNA anti TeloC no tuvo ningún impacto significativo en la tasa de crecimiento de las células de fibroblastos humanos que expresan telomerasa, ya sea transformadas (BJ ELR) o normales (BJ hTERT) (Figura 4).

50 Para controlar el impacto del tratamiento con LNA en los biomarcadores de ALT, los inventores evaluaron la presencia de cuerpos de PML (APB) asociados a ALT, estructuras nucleares que contienen factores de recombinación y ADN telomérico específico de células ALT (Henson y Reddel, 2010). Mediante una inmunotinción indirecta contra la proteína PML, los inventores observaron una disminución de APB en células U-2 OS tratadas con el LNA anti TeloC, en comparación con el control o el LNA anti TeloG (Figura 5).

Para extender sus observaciones, los inventores transfectaron las líneas celulares ALT-positivas U-2 OS, Saos-2 y WI-38 VA-13 con anti TeloG y anti TeloC LNA. El LNA anti TeloC inhibió significativamente el crecimiento celular en las tres líneas celulares analizadas (Figura 6).

El esqueleto de fosforotioato ("PS") es una modificación que hace que un oligonucleótido sea más resistente a la degradación de la nucleasa y que se usa comúnmente para mejorar la actividad de los oligonucleótidos, especialmente in vivo. Los inventores diseñaron moléculas de LNA que tienen la misma secuencia del LNA de fosfodiéster, pero con un esqueleto de fosforotioato completo (LNA de PS, ver Material y Métodos). El PS anti TeloC LNA previene el crecimiento de células U-2 OS a una concentración de 20 nM, que es 10 veces menor que la concentración utilizada para el LNA de fosfodiéster (Figura 7 y 8), mientras que tuvo un efecto menor en las células BJ hTERT, utilizado como control.

Se ha demostrado que los llamados "oligonucleótidos de LNA pequeños/cortos", que tienen al menos 6nt, preferiblemente al menos 8nt de oligonucleótidos de LNA completamente largos, se dirigen específicamente a su objetivo de ARN complementario, tanto in vitro como in vivo (Obad et al., 2011). Los inventores diseñaron oligonucleótidos de LNA pequeños/cortos con un esqueleto de fosforotioato, denominado "anti TeloC diminuto" y "anti TeloG diminuto", que tienen 8 nucleótidos de longitud y se dirigen a las transcripciones teloméricas (Figura 9).

Las células U-2 OS transfectadas con oligonucleótidos anti TeloC diminutos crecieron significativamente menos que las células transfectadas simuladas o las células transfectadas con un control o un oligonucleótido anti TeloG diminuto (Figura 10). El efecto fue específico para las células ALT porque el LNA anti TeloC no perjudicaba el crecimiento celular en fibroblastos humanos normales (células BJ) (Figura 11).

Sin embargo, el impacto del oligonucleótido anti TeloC diminuto en el crecimiento celular fue menos pronunciado en comparación con el LNA anti TeloC PS, usado con la misma molaridad (Figura 10).

Al usar una cantidad 3 veces mayor de los oligos de LNA diminutos (60 nM) proporcionales a su longitud más corta y, por lo tanto, a su capacidad de complementarse con un ARN de repeticiones teloméricas, los inventores observaron un efecto inhibitorio respecto a la proliferación de células ALT del LNA anti TeloC diminuto, similar al PS anti TeloC LNA a una concentración de 20 nM (Figura 12). También a esta concentración más alta, el efecto del LNA anti TeloC diminuto/corto fue específico para las células ALT (Figura 13).

La alteración del crecimiento mediada por LNA anti TeloC, tanto por LNA PS como por el LNA diminuto, estuvo acompañada por la inducción de la apoptosis, evidenciada por la escisión de caspasa-3 y el aumento de células sub G-1 indicativas de muerte celular, como se muestra por el análisis FACS, así como por caspasa-3 y la escisión de PARP-1, como se muestra por análisis de transferencia Western (Figura 24). Además, las células U-2 OS transfectadas con LNA anti TeloC mostraron una fase S alargada (Figura 25), indicativa del estrés de replicación exacerbado, que se cree que está relacionado con el mecanismo ALT (O'Sullivan y Karlseder, 2010).

Para probar aún más la especificidad de los LNA anti TeloC, los inventores probaron el efecto de la transfección de LNA en las líneas celulares emparejadas SW26 (ALT) y SW39 (telomerasas positivas), descritas anteriormente. Los LNA anti TeloC inhibieron el crecimiento de las células ALT mucho más que los controles no ALT coincidentes (Figura 26).

Como la transfección de las células se puede lograr in vitro, pero no in vivo, es importante probar la capacidad de las células para captar el LNA "desnudo", sin agente de transfección. Este proceso se denomina "entrega gimnástica" y se cree que es un mejor predictor de la efectividad de un tratamiento in vivo (Stein et al., 2010). Por lo tanto, los inventores buscaron determinar la eficacia del suministro desnudo de LNA en múltiples líneas celulares de ALT.

El suministro desnudo de LNA fue eficaz en células U-2 OS, tanto PS anti TeloC LNA como anti TeloC LNA diminuto inhibieron el crecimiento celular (Figura 27 A, B). Mientras tanto, las células tratadas con control y anti TeloG no se vieron afectadas.

Para demostrar que la eficacia de los oligonucleótidos del esqueleto de fosforotioato no se limitaba a las líneas celulares de osteosarcoma, los inventores los probaron en otro tipo de células, la línea celular de glioblastoma ALT-positivo GBM14 (Heaphy et al., 2011) mediante entrega desnuda. Solo el PS anti TeloC y el anti TeloC LNA diminuto redujeron significativamente el crecimiento celular en comparación con las células no tratadas (Figura 14, 15).

Otra línea celular ALT-positiva, G-292, es capaz de crecer como un xenoinjerto en ratones (Lauvrak et al., 2013). Los inventores primero determinaron que esta línea celular también se veía afectada por solo LNA anti TeloC y no por controles (Figura 28). Luego, determinaron la eficacia de la entrega desnuda, descubriendo que PS anti TeloC y anti TeloC diminuto eran capaces de inhibir el crecimiento, mientras que los controles respectivos PS anti TeloG, Control diminuto y anti TeloG diminuto no tenían ningún efecto (Figura 29).

Para evaluar la eficacia del tratamiento ASO en el crecimiento de tumores ALT positivos in vivo, se inyectaron células G 292 en el costado de ratones desnudos, hasta que formaron una masa tumoral detectable. Los ratones que llevaban el tumor fueron tratados intraperitonealmente con ASO. Tanto el PS anti TeloC como el anti TeloC diminuto redujeron el crecimiento tumoral en comparación con los ratones inyectados con vehículo (PBS) (Figura 16). Los inventores no realizaron ningún estudio de dosis máxima tolerada, por lo tanto, es posible que una dosis más alta pueda tener un efecto inhibitorio más fuerte sobre el crecimiento tumoral. Además, el PS anti TeloC y el anti TeloC diminuto aumentaron el tiempo necesario para que el tumor alcanzara el tamaño de 1 cm³ (Figura 17).

Los inventores probaron la eficacia y la especificidad de otra clase de ASO, 2'-o-metil (2'-O-Me) ASO con un esqueleto de fosforotioato. Solo el U-2 OS transfectado con 2'-O-Me anti-TeloC creció significativamente menos que las células transfectadas simuladas, mientras que el control y antiTeloG ASO no afectaron el crecimiento celular (Figura 30). Es importante destacar que, cuando se usa a la misma concentración (20 nM), el efecto 2'-O-Me anti-TeloC sobre el crecimiento celular fue mayor que el PS anti TeloC. De manera diferente, el 2'-O-Me anti-TeloC no perjudicó el crecimiento de las células BJ. Además, los ASO 2'-O-Me no fueron tóxicos hasta 100 nM (Figura 31).

Condiciones no cancerosas asociadas con la disfunción de los telómeros

La inactivación genética de las funciones de la telomerasa en los peces *Danio rerio* (pez cebra) induce la disfunción de los telómeros y una serie de eventos patológicos que recapitulan el envejecimiento de forma acelerada (Anchelin et al., 2013; Carneiro et al., 2016). Por lo tanto, este es un modelo vertebrado fiel establecido de la disfunción de los telómeros, en particular del envejecimiento fisiológico. Los animales de pez cebra mutantes en telomerasa de segunda generación se estudiaron debido a un fenotipo más fuerte en comparación con el pez cebra de primera generación. Los animales se caracterizan por defectos morfológicos y una vida útil más corta y mueren pocos días después del nacimiento. Se inyectaron PS LNA en embriones de una célula de peces mutantes en telomerasa de primera generación, que se cruzaron para obtener una segunda generación. Los peces nacidos de individuos tratados con anti TeloC o anti TeloG mostraron una reducción significativa de los defectos morfológicos asociados con el envejecimiento prematuro (Figura 18) y sobrevivieron más tiempo (Figura 19).

Los inventores infectaron fibroblastos humanos normales con un vector que expresaba la forma mutada del gen de Lamin A, también conocido como progerina (Gonzalo et al., 2016) o el gen Lamin A de tipo salvaje como control. Este gen está mutado en los pacientes con HGPS y su expresión conduce a una desaceleración del crecimiento celular y a una senescencia prematura, recapitulando el fenotipo de envejecimiento prematuro observado en el síndrome de telómero, como con los pacientes con HGPS.

Se ha demostrado que la expresión de progerina causa disfunción telomérica (Chojnowski et al., 2015). Los inventores monitorizaron el crecimiento celular de estas células tras la transfección de PS LNA. En presencia de PS anti TeloC o PS anti TeloG, las células que expresaban progerina crecieron más que las células transfectadas simuladas o transfectadas con el LNA control de PS, tal como se monitoriza mediante la incorporación de BrdU y la expresión del marcador de proliferación KI67 (Figura 20), a pesar de ostentar similares niveles de expresión de progerina (Figura 21). Estos resultados sugieren que los ASO que se dirigen a los tDDRNA son capaces de prevenir el establecimiento de la senescencia inducida por progerina.

Un modelo de ratón HGPS, que expresa la progerina en los queratinocitos epidérmicos muestra hiperplasia epidérmica, anomalías graves de la piel, adelgazamiento del cabello, hiperqueratosis marcada, fibrosis moderada de la dermis, infiltración por células inflamatorias y mueren en las primeras dos semanas postnatales (McKenna et al., 2014). Los inventores trataron a los ratones que expresan progerina y naturales con PS anti TeloG LNA una vez durante el embarazo, inyectando a las hembras embarazadas y cada 3 días después del nacimiento. El tratamiento con el anti TeloG prolongó significativamente la vida útil de los ratones progerícos, en comparación con los animales no tratados (Figura 22).

Referencias

Anchelin, M., Alcaraz-Perez, F., Martinez, C.M., Bernabe-Garcia, M., Mulero, V., and Cayuela, M.L. (2013). Premature aging in telomerase-deficient zebrafish. *Dis Model Mech* 6, 1101- 1112.

Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. *Nature reviews Genetics* 13, 693-704.

Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318, 798-801.

Bechter, O.E., Zou, Y., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2003). Homologous recombination in human telomerase-positive and ALT cells occurs with the same frequency. *EMBO Rep* 4, 1138-1143.

Begg, A.C., Stewart, F.A., and Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer* 11, 239-253.

Benson, E.K., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2010). Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J Cell Sci* 123, 2605-2612.

Carneiro, M.C., Henriques, CM., Nabais, J., Ferreira, T., Carvalho, T., and Ferreira, M.G. (2016). Short Telomeres in Key Tissues Initiate Local and Systemic Aging in Zebrafish. *PLoS Genet* 12, e1005798.

Cawthon, R.M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e47.

Celli, G.B., and de Lange, T. (2005). DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* 7, 712-718.

- Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 11, 319-330.
- Chojnowski, A., Ong, P.F., Wong, E.S., Lim, J.S., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Dutta, B., Yang, H., Liow, Y.Y., Sze, S.K., et al. (2015). Progerin reduces LAP2alpha-telomere association in Hutchinson-Gilford progeria. *Elife* 4.
- 5 d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 8, 512-522.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- 10 Durant, S.T. (2012). Telomerase-independent paths to immortality in predictable cancer subtypes. *J Cancer* 3, 67-82.
- Feng, F.Y., de Bono, J.S., Rubin, M.A., and Knudsen, K.E. (2015). Chromatin to Clinic: The Molecular Rationale for PARP1 Inhibitor Function. *Mol Cell* 58, 925-934.
- Flynn, R.L., Cox, K.E., Jeitany, M., Wakimoto, H., Bryll, A.R., Ganem, N.J., Bersani, F., Pineda, J.R., Suva, M.L., Benes, C.H., et al. (2015). Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science* 347, 273-277.
- 15 Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., de Hoon, M., Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., and d'Adda di Fagagna, F. (2012). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* 488, 231-235.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C.M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* 14, 355- 365.
- 20 Gonzalo, S., Kreienkamp, R., and Askjaer, P. (2016). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev*.
- Gray, K., Kumar, S., Figg, N., Harrison, J., Baker, L., Mercer, J., Littlewood, T., and Bennett, M. (2015). Effects of DNA damage in smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res* 116, 816-826.
- 25 Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
- Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Jiao, Y., Klein, A.P., Edil, B.H., Shi, C., Bettgowda, C., Rodriguez, F.J., Eberhart, C.G., Hebbar, S., et al. (2011). Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 333, 425.
- 30 Henriques, C.M., Carneiro, M.C., Tenente, I.M., Jacinto, A., and Ferreira, M.G. (2013). Telomerase is required for zebrafish lifespan. *PLoS Genet* 9, e1003214.
- Henson, J.D., and Reddel, R.R. (2010). Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS letters* 584, 3800-3811.
- 35 Herbig, U., Ferreira, M., Condell, L., Carey, D., and Sedivy, J.M. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science* 311, 1257.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 14, 501-513.
- Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F.D., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., and Passos, J.F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* 3, 708.
- 40 Hogrefe, R.I. (1999). An antisense oligonucleotide primer. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9, 351-357.
- Hu, J., Hwang, S.S., Liesa, M., Gan, B., Sahin, E., Jaskeliouff, M., Ding, Z., Ying, H., Boutin, A.T., Zhang, H., et al. (2012). Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. *Cell* 148, 651-663.
- 45 Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.
- Janssen, H.L., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368, 1685-1694.

- Jiang, W.Q., Zhong, Z.H., Henson, J.D., Neumann, A.A., Chang, A.C., and Reddel, R.R. (2005). Suppression of alternative lengthening of telomeres by SplOO-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex. *Mol Cell Biol* 25, 2708-2721.
- 5 Jiang, W.Q., Zhong, Z.H., Henson, J.D., and Reddel, R.R. (2007). Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference. *Oncogene* 26, 4635-4647.
- Kamranvar, S.A., Chen, X., and Masucci, M.G. (2013). Telomere dysfunction and activation of alternative lengthening of telomeres in B-lymphocytes infected by Epstein-Barr virus. *Oncogene* 32, 5522-5530.
- Kelley, M.R., Logsdon, D., and Fishel, M.L. (2014). Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol* 10, 1215-1237.
- 10 Kudlow, B.A., Stanfel, M.N., Burtner, C.R., Johnston, E.D., and Kennedy, B.K. (2008). Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. *Mol Biol Cell* 19, 5238-5248.
- Lauvrak, S.U., Munthe, E., Kresse, S.H., Stratford, E.W., Namlos, H.M., Meza-Zepeda, L.A., and Myklebost, O. (2013). Functional characterisation of osteosarcoma cell lines and identification of mRNAs and miRNAs associated with aggressive cancer phenotypes. *Br J Cancer* 109, 2228-2236.
- 15 Lee, M., Hills, M., Conomos, D., Stutz, M.D., Dagg, R.A., Lau, L.M., Reddel, R.R., and Pickett, H.A. (2014). Telomere extension by telomerase and ALT generates variant repeats by mechanistically distinct processes. *Nucleic Acids Res* 42, 1733-1746.
- Li, Z., and Rana, T.M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov* 13, 622-638.
- 20 Lu, Y., Leong, W., Guerin, O., Gilson, E., and Ye, J. (2013). Telomeric impact of conventional chemotherapy. *Front Med* 7, 411-417.
- McKenna, T., Rosengardten, Y., Viceconte, N., Baek, J.H., Grochova, D., and Eriksson, M. (2014). Embryonic expression of the common progeroid lamin A splice mutation arrests postnatal skin development. *Aging Cell* 13, 292-302.
- 25 Monteleone, G., Neurath, M.F., Ardizzone, S., Di Sabatino, A., Fantini, M.C., Castiglione, F., Scribano, M.L., Armuzzi, A., Caprioli, F., Sturniolo, G.C., et al. (2015). Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease. *N Engl J Med* 372, 1104-1113.
- Muller, S., and Rodriguez, R. (2014). G-quadruplex interacting small molecules and drugs: from bench toward bedside. *Expert Rev Clin Pharmacol* 7, 663-679.
- 30 Neidle, S. (2010). Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G- quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS J* 277, 1118-1125.
- O'Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 171-181.
- 35 Obad, S., dos Santos, CO., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C, Fu, C, Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E.M., et al. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet* 43, 371-378.
- Opresko, P.L., and Shay, J.W. (2016). Telomere-associated aging disorders. *Ageing Res Rev*.
- Page, D.T., and Cudmore, S. (2001). Innovations in oral gene delivery: challenges and potentials. *Drug Discov Today* 6, 92-101.
- 40 Pollex, R.L., and Hegele, R.A. (2004). Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clin Genet* 66, 375-381.
- Potts, P.R., and Yu, H. (2007). The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* 14, 581-590.
- Ruden, M., and Puri, N. (2013). Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev* 39, 444-456.
- 45 Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. (2000). Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*. 287(5456): 1253-8.
- Salvati, E., Rizzo, A., Iachettini, S., Zizza, P., Cingolani, C, D'Angelo, C, Porru, M., Mondello, C, Aiello, A., Farsetti, A., et al. (2015). A basal level of DNA damage and telomere deprotection increases the sensitivity of cancer cells to G-quadruplex interactive compounds. *Nucleic Acids Res* 43, 1759-1769.

Sanjiv, K., Hagenkort, A., Calderon-Montano, J.M., Koolmeister, T., Reaper, P.M., Mortusewicz, O., Jacques, S.A., Kuiper, R.V., Schultz, N., Scobie, M., et al. (2016). Cancer- Specific Synthetic Lethality between ATR and CHK1 Kinase Activities. *Cell Rep* 14, 298- 309.

5 Satyanarayana A, Wiemann SU, Buer J, Lauber J, Dittmar KE, Wustefeld T, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. (2003) Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J.* 22 (15), 4003-13.

Sissi, C, and Palumbo, M. (2014). Telomeric G-quadruplex architecture and interactions with potential drugs. *Curr Pharm Des* 20, 6489-6509.

10 Stein, C.A., Hansen, J.B., Lai, J., Wu, S., Voskresenskiy, A., Hog, A., Worm, J., Hedtjarn, M., Souleimanian, N., Miller, P., et al. (2010). Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res* 38, e3.

Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., and Kauppinen, S. (2012). Inhibition of micro RNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* 3, 1.

15 Veedu, R.N., and Wengel, J. (2010). Locked nucleic acids: promising nucleic acid analogs for therapeutic applications. *Chem Biodivers* 7, 536-542.

Wang, J., Uryga, A.K., Reinhold, J., Figg, N., Baker, L., Finigan, A., Gray, K., Kumar, S., Clarke, M., and Bennett, M. (2015). Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Promotes Atherosclerosis and Features of Plaque Vulnerability. *Circulation* 132, 1909-1919.

20 Ward, A., Khanna, K.K., and Wiegman, A.P. (2015). Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51. *Cancer Treat Rev* 41, 35-45.

Weber, A.M., and Ryan, A.J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* 149, 124-138.

Xi, H., Li, C, Ren, F., Zhang, H., and Zhang, L. (2013). Telomere, aging and age-related diseases. *Aging Clin Exp Res* 25, 139-146.

25 Yeager, T.R., Neumann, A.A., Englezou, A., Huschtscha, L.I., Noble, J.R., and Reddel, R.R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* 59, 4175-4179.

Zhong, Z.H., Jiang, W.Q., Cesare, A.J., Neumann, A.A., Wadhwa, R., and Reddel, R.R. (2007). Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 282, 29314-29322.

30 **Listado de secuencias**

<110> IFOM D'ADDA DI FAGAGNA, Fabrizio ROSSIELLO, Francesca AGUADO, Julio JONES-WEINERT, Corey

<120> Oligonucleótidos terapéuticos

35 <130> PCT 130108

<150> EP15178809.8

<151> 29-07-2015

40 <160> 34

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 6

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> sintético

<400> 1

ttaggg 6

55 <210> 2

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

5 <220>
 <223> sintético

<400> 2
 tagggt 6

10 <210> 3
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintético

<400> 3
 aggggt 6

<210> 4
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintético

<400> 4
 ggggta 6

<210> 5
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintético

<400> 5
 ggtag 6

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

45 <220>
 <223> sintético

<400> 6
 gtagg 6

<210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> sintético

<400> 7
 tagcaccatt tgaatcagt gtt 23

60 <220>
 <223> sintético

<400> 7
 tagcaccatt tgaatcagt gtt 23

65 <210> 8

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintético

<400> 8
 cgaattccac aaattggtat cc 22

10 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintético

<400> 9
 tagggtagg gtagggt 18

20 <210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintético

30 <400> 10
 ccctaaccct aaccctaa 18

<210> 11
 <211> 18

35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

40 <400> 11
 ttcattgtgg gagcagac 18

<210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintético

50 <400> 12
 cagcagtttc tccagagc 18

55 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> sintético

<400> 13
 ccctaaccct aaccctaa 18

65 <210> 14

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintético

<400> 14
 tagggtagg gtagggt 18

10 <210> 15
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintético

<400> 15
 20 cggttgtt gggttgggt ttgggttg gttgggtt 39

<210> 16
 <211> 39
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

30 <400> 16
 ggctgcctt accctaccc ttaccctac cctaccct 39

<210> 17
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

40 <400> 17
 agatcgaag agcacacgtc tgaactccag tcac 34

<210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> sintético

<400> 18
 acacucuuuc ccuacacgac gcucuuccga ucu 33

55 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> sintético

<400> 19
 65 actgatagg agtggtaac t 21

<210> 20

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

5 <220>
 <223> sintético

<400> 20
 ccctaaccct aaccctaacc c 21

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

15 <220>
 <223> sintético

<400> 21
 20 gggtaggggt tagggtagg g 21

<210> 22
 <211> 8
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

30 <400> 22
 cgtcatac 8

<210> 23
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

40 <400> 23
 caatccaat cccaatcca a 21

<210> 24
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintético

50 <400> 24
 uuaggguuag gguuaggg 18

55 <210> 25
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> sintético

<400> 25
 ttagggtag ggtaggggt agggtaggg ttagggtag gg 42

65 <210> 26

ES 2 781 459 T3

<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> sintético

<400> 26
aatccaatc ccaatcccaa tccaatccc aatccaatc cc 42

10 <210> 27
<211> 18
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> sintético

<400> 27
20 aaucccauc ccaauccc 18

<210> 28
<211> 21
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

30 <400> 28
gttagggta gggtagggt t 21

<210> 29
<211> 34
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

40 <400> 29
gtgactggag ttcagacgtg tgctctccg atct 34

<210> 30
<211> 58
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> sintético

<400> 30
aatgatacgg cgaccaccga gatctacact cttccctac acgacgctct tccgatct 58

55 <210> 31
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> sintético

<400> 31
caagcagaag acggcatacg agatcggctct cggcattcct gctgaaccgc tcttccgatc 60

t 61

ES 2 781 459 T3

<210> 32
<211> 58
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

10 <400> 32
aatgatacgg cgaccaccga gatctacact cttccctac acgacgctct tccgatct 58

<210> 33
<211> 64
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

20 <400> 33
caagcagaag acggcatacag agatcgtgat gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg 60
atct 64

<210> 34
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> sintético

<400> 34
uuauccgcuc acaauuccac au 22

35

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que comprende una de las siguientes secuencias:

(TTAGGG) SEQ ID No. 1, (TAGGGT) SEQ ID No. 2, (AGGGTT) SEQ ID No. 3, (GGGTTA) SEQ ID No. 4, (GGTTAG) SEQ ID No. 5 o (GTTAGG) SEQ ID No. 6 o una variante o una mezcla de estas para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad caracterizada por un alargamiento alternativo de los telómeros, en el que la variante comprende una de las siguientes secuencias: TCAGGG, TTCGGG, GTAGGG, TGAGGG, TTGGGG, TAAGGG, ATAGGG, CTAGGG, TTTGGG o TTAAGGG.

2. El oligonucleótido o su variante para usar según la reivindicación 1 que comprende una de las siguientes secuencias: (TTAGGG)_n, (TAGGGT)_n, (AGGGTT)_n, (GGGTTA)_n, (GGTTAG)_n o (GTTAGG)_n, donde 1 < n < 1000, preferiblemente 1 < n < 500, preferiblemente 1 < n < 200, preferiblemente 1 < n < 100, preferiblemente 1 < n < 50, preferiblemente 1 < n < 20, preferiblemente 1 < n < 10, preferiblemente 1 < n < 5.

3. El oligonucleótido para usar según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho oligonucleótido es complementario a la secuencia de un ARN, siendo dicho ARN una transcripción de ARN sintetizada usando un ADN telomérico disfuncional específico como plantilla para la transcripción o un fragmento de dicha transcripción de ARN, siendo dicho fragmento (DDRNA) generado procesando Dicer y/o Drosha.

4. El oligonucleótido para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad es cáncer o una infección por el virus de Epstein-Bar.

5. El oligonucleótido para usar según la reivindicación 4, en el que la enfermedad es un cáncer ALT positivo.

6. El oligonucleótido para usar según la reivindicación 4 o 5, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: sarcoma de tejido blando, preferiblemente condrosarcoma, sarcomas pleomórficos indiferenciados que incluyen histiocitoma fibroso maligno, leiomiomasarcoma, sarcoma epitelióide, liposarcoma, fibrosarcoma y variantes, angiosarcoma y neurofibroma, cáncer del sistema nervioso central, preferiblemente astrocitoma difuso de grado 2; astrocitoma anaplásico de grado 3; glioblastoma pediátrico de grado 4 multiforme, oligodendroglioma, meduloblastoma anaplásico, astrocitoma pilocítico de grado 1, meduloblastoma no anaplásico, meningioma, schwannoma, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de células pequeñas y carcinoma urotelial invasivo, cáncer de glándula suprarrenal o cáncer del sistema nervioso periférico, en particular ganglioneuroblastoma, neuroblastoma y feocromocitoma, neoplasias neuroendocrinas como paraganglioma y tumor carcinoide, cáncer de riñón, en particular carcinoma cromóforo, carcinoma sarcomatoide y carcinomas de células claras y papilares, cáncer de pulmón y pleural, en particular mesotelioma maligno, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas, cáncer de piel tal como melanoma maligno, cáncer de hígado tal como carcinoma hepatocelular, cáncer de testículo tal como tumor de células germinales no seminomatosas, cáncer de mama, en particular carcinoma lobular; carcinoma ductal y carcinoma medular, cáncer de útero como el carcinoma seroso de endometrio, carcinoma escamoso de cuello uterino, cáncer de ovario, en particular carcinoma de células claras, carcinoma endometriode, cáncer de vesícula biliar como adenocarcinoma, cáncer de esófago.

7. Un oligonucleótido que comprende una de las siguientes secuencias:

(TTAGGG) SEQ ID No. 1, (TAGGGT) SEQ ID No. 2, (AGGGTT) SEQ ID No. 3, (GGGTTA) SEQ ID No. 4, (GGTTAG) SEQ ID No. 5 o (GTTAGG) SEQ ID No. 6 o una secuencia complementaria de estas o un fragmento o una variante o una mezcla de estas para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una afección no cancerosa asociada con la disfunción de los telómeros, en el que la variante comprende una de las siguientes secuencias: TCAGGG, TTCGGG, GTAGGG, TGAGGG, TTGGGG, TAAGGG, ATAGGG, CTAGGG, TTTGGG o TTAAGGG.

8. El oligonucleótido o su secuencia complementaria o su variante para usar según la reivindicación 7 que comprende una de las siguientes secuencias: (TTAGGG)_n, (TAGGGT)_n, (AGGGTT)_n, (GGGTTA)_n, (GGTTAG)_n o (GTTAGG)_n, donde 1 < n < 1000, preferiblemente 1 < n < 500, preferiblemente 1 < n < 200, preferiblemente 1 < n < 100, preferiblemente 1 < n < 50, preferiblemente 1 < n < 20, preferiblemente 1 < n < 10, preferiblemente 1 < n < 5.

9. El oligonucleótido para usar según la reivindicación 7 u 8, en el que la afección no cancerosa asociada con la disfunción de los telómeros se selecciona del grupo que consiste en: síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGFS), síndrome de Werner, síndrome de Bloom, telangiectasia de ataxia, IPF familiar, IPF esporádica, anemia aplásica, disqueratosis congénita autosómica dominante, LMA-MDS familiar, disqueratosis congénita de novo, disqueratosis congénita recesiva ligada al cromosoma X, síndrome de Hoyeraal-Hreiderasson, síndrome de Revesz, disqueratosis congénita autosómica recesiva, síndrome de Coats plus, afección causada por mutaciones o inactivación de cualquiera de TRF1, POT1, TPP1, TIN2, RAP1 o TRF2, alteración de la regeneración tras una hepatectomía parcial, fibrosis hepática, inflamación crónica del hígado, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, diferenciación progenitora mielóide alterada, insuficiencia de la médula ósea, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos neurológicos que incluyen la enfermedad de Alzheimer, osteoporosis, aterosclerosis, enfermedad cardíaca, distrofia muscular de Duchenne, diabetes tipo 2, fertilidad deteriorada, cicatrización de heridas deteriorada, artritis, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad, envejecimiento.

10. El oligonucleótido para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores es un oligonucleótido modificado con ácido nucleico bloqueado (LNA), un oligonucleótido modificado con 2'-o-metilo, un oligonucleótido modificado con fosforotioato, un ácido nucleico bloqueado modificado con fosforotioato, un oligonucleótido modificado con 2'-o-metoxietilo, un 2-o-[2-(N-metilcarbamoil)etil]ribonucleósido, un metilfosfonato, un oligonucleótido morfolino, un oligonucleótido gapmer LNA-ADN-LNA, un mezclador, un ADN-ARN quimérico 2'-o-metil gapmer, un N3'-P5'-fosforoamidato, un ácido 2'-fluoro-arabino nucleico, un fosforoamidato morfolino, ácido ciclohexeno nucleico, un Triciclo-DNA, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico desbloqueado, un ácido nucleico de hexitol, un oligonucleótido de boranofosfato, un oligonucleótido de fosfoamidato, preferiblemente dicho oligonucleótido modificado está fosforotioado.
- 5
- 10 11. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad caracterizada por un alargamiento alternativo de telómeros o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una afección no cancerosa asociada con la disfunción telomérica.
- 15 12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11 que comprende además al menos otro agente terapéutico, preferiblemente el otro agente terapéutico es un agente antitumoral, un agente contra el dolor o un agente antiemético.
- 20 13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el otro agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: inhibidor de ATR, inhibidor de DDR, inhibidor de HR, molécula que se dirige específicamente a los telómeros, preferiblemente moléculas que interactúan con G-cuadruplexes, molécula que causa la generación de daño en el ADN en los telómeros.

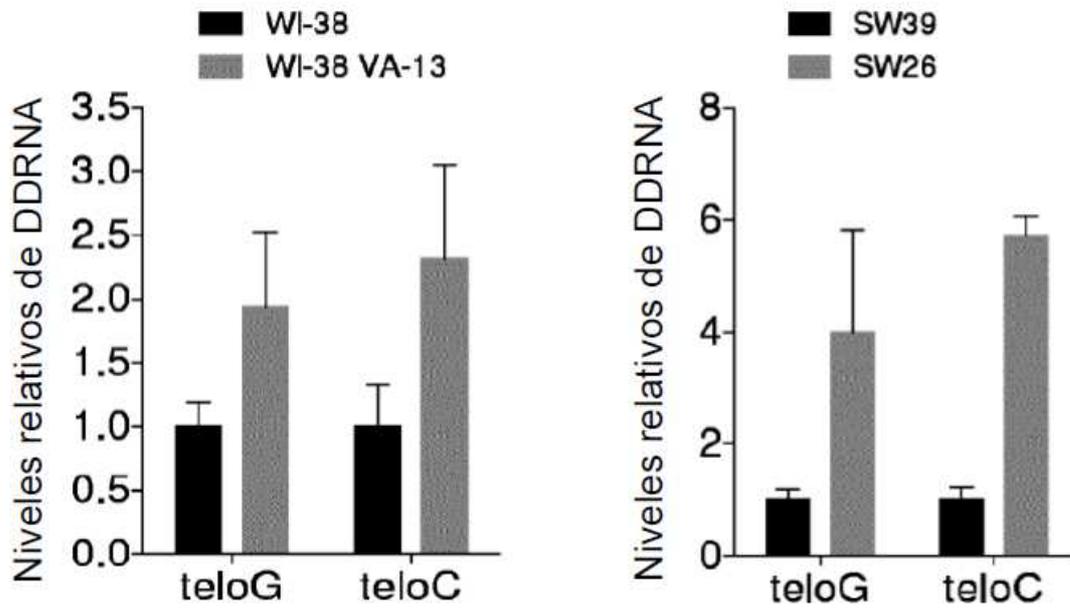


Fig. 3

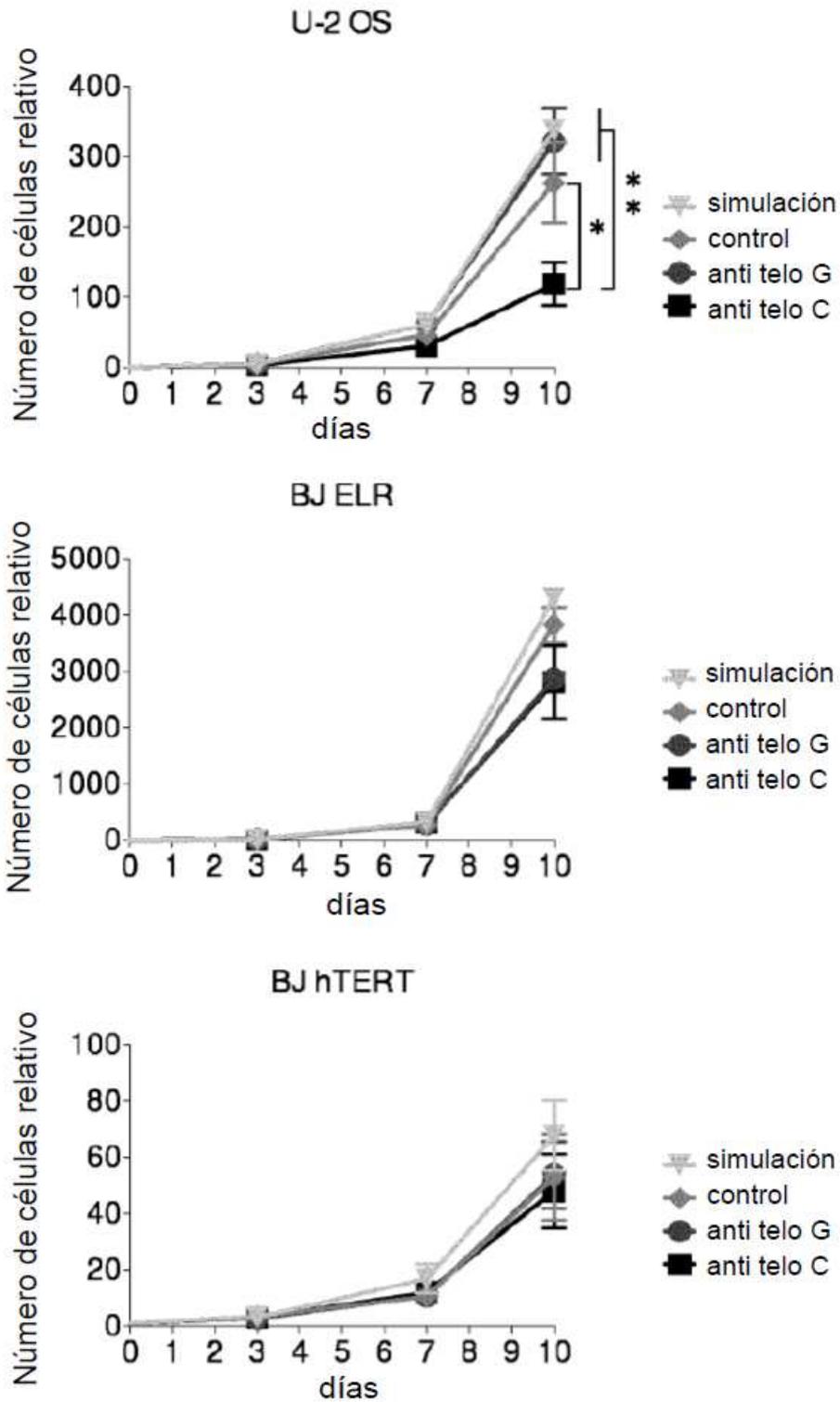


Fig. 4

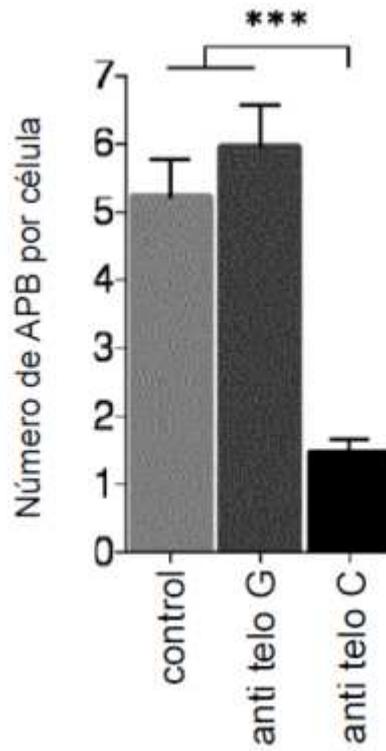


Fig. 5

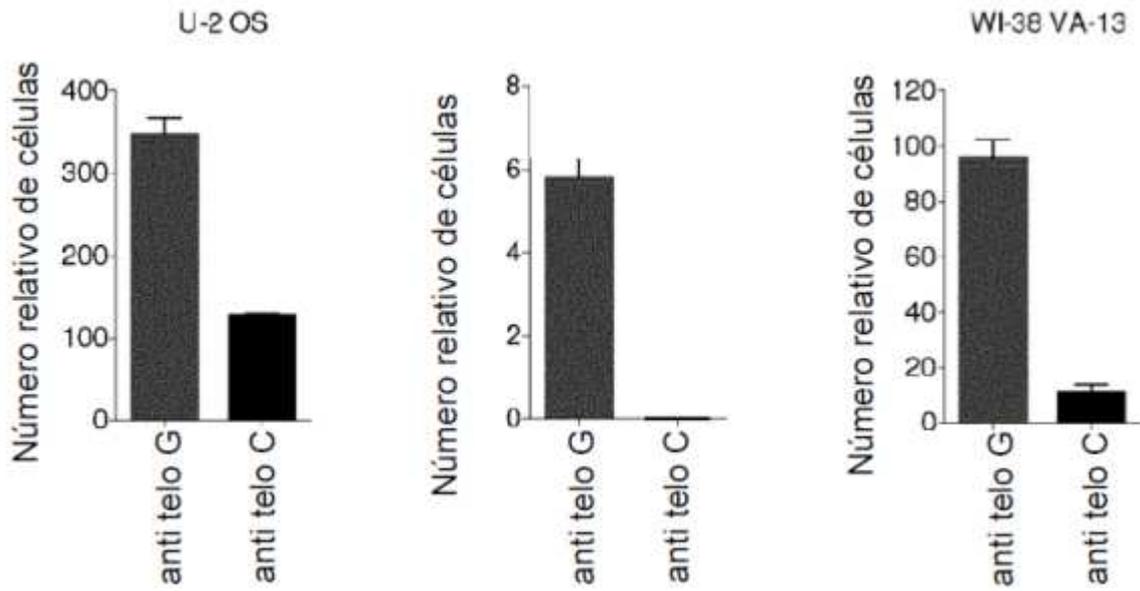


Fig. 6

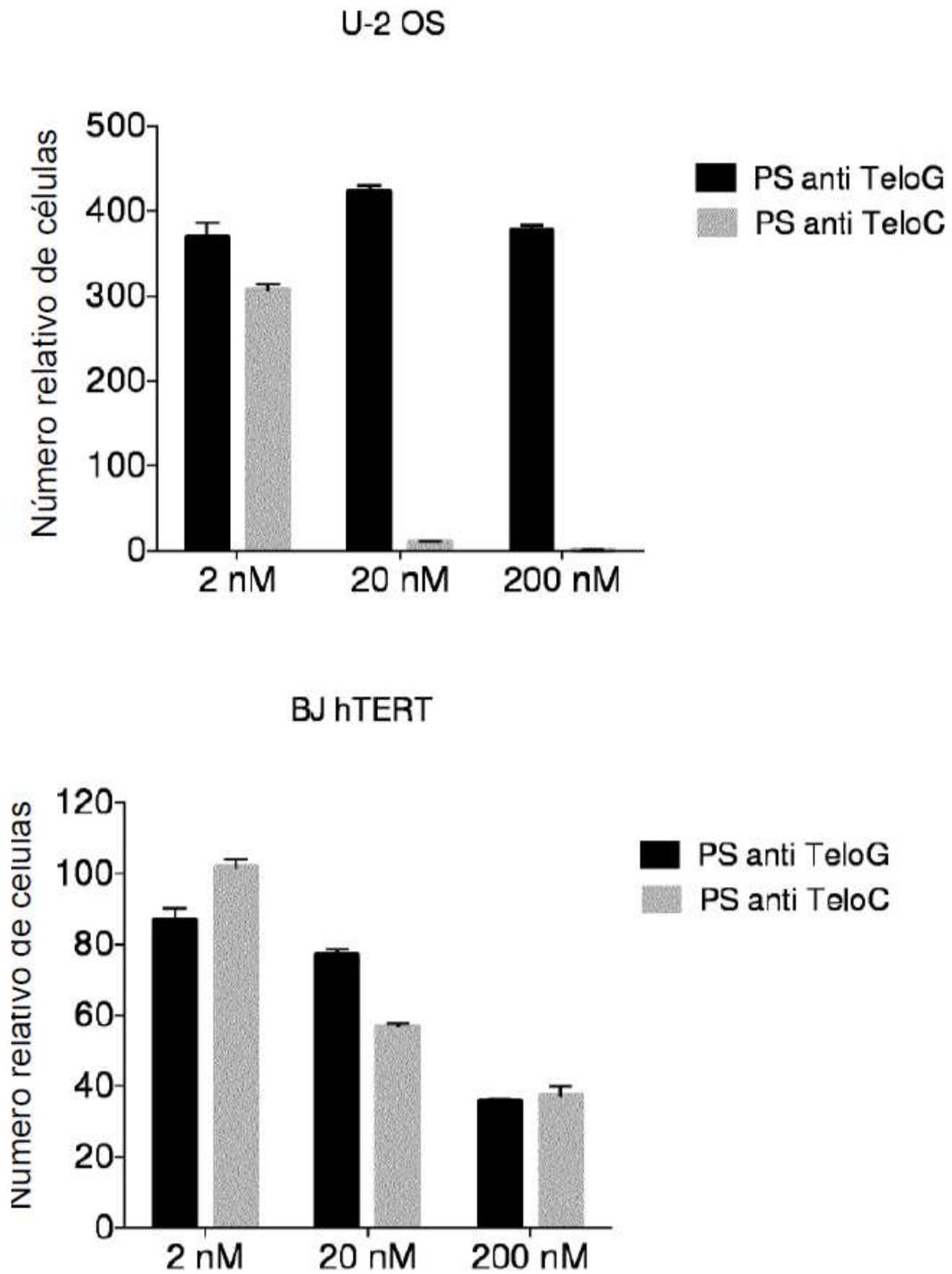


Fig. 7

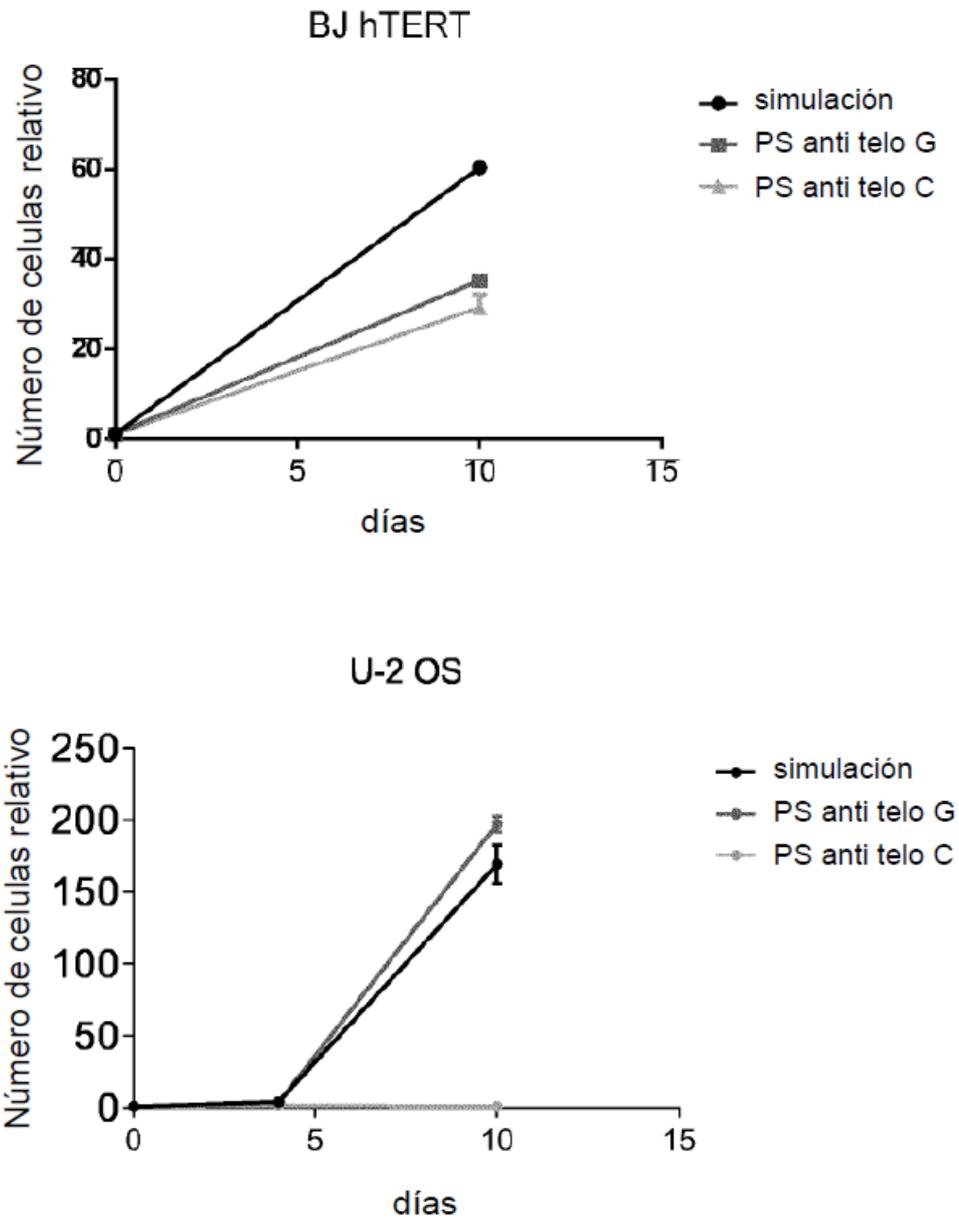


Fig. 8

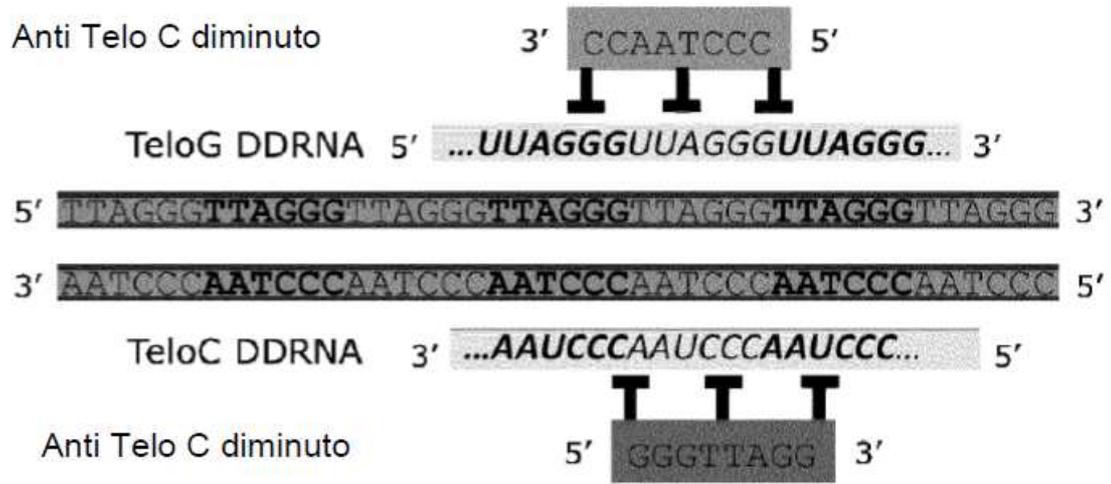


Fig. 9

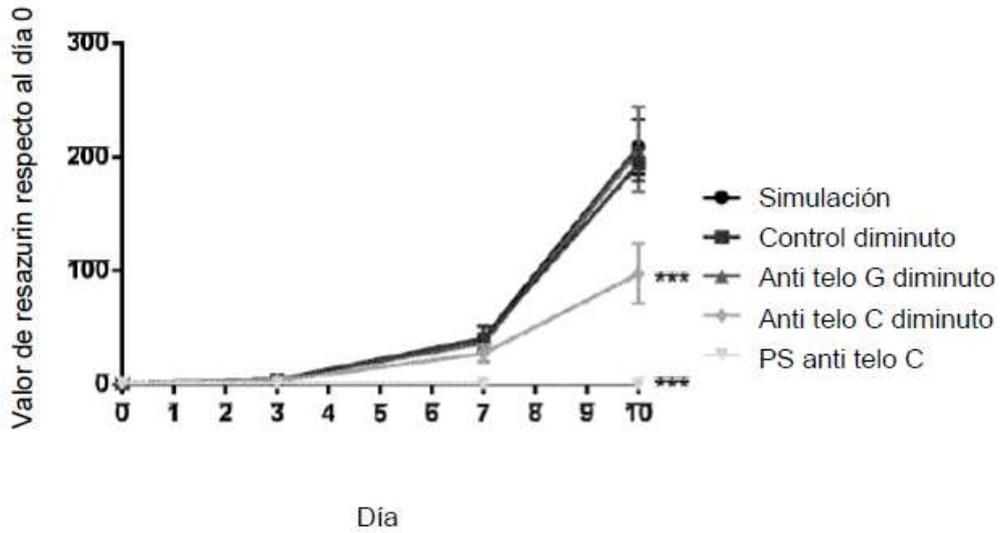
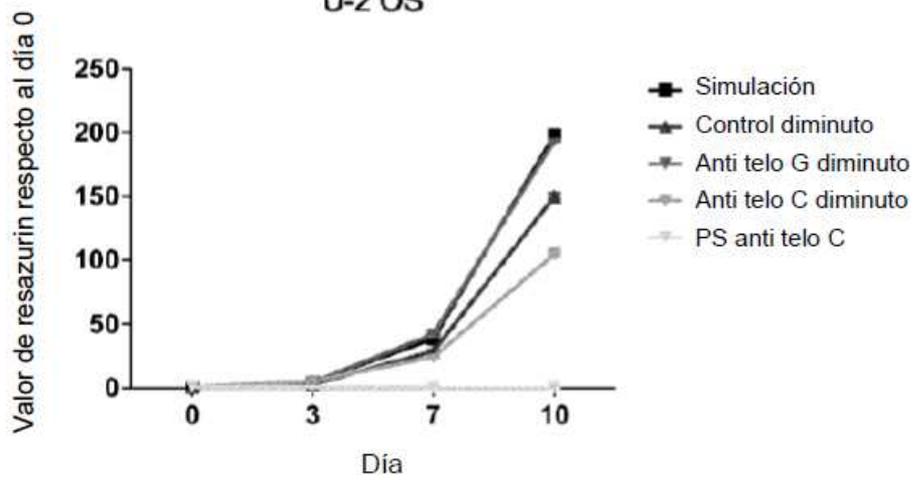


Fig. 10

U-2 OS



BJ

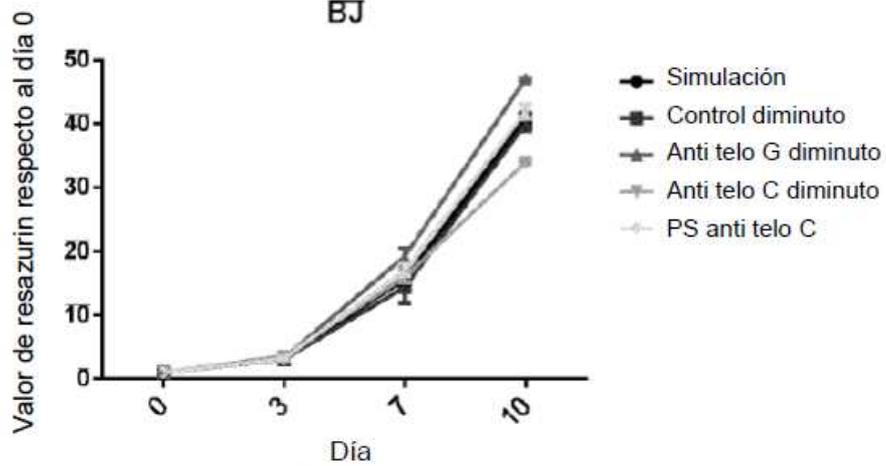


Fig. 11

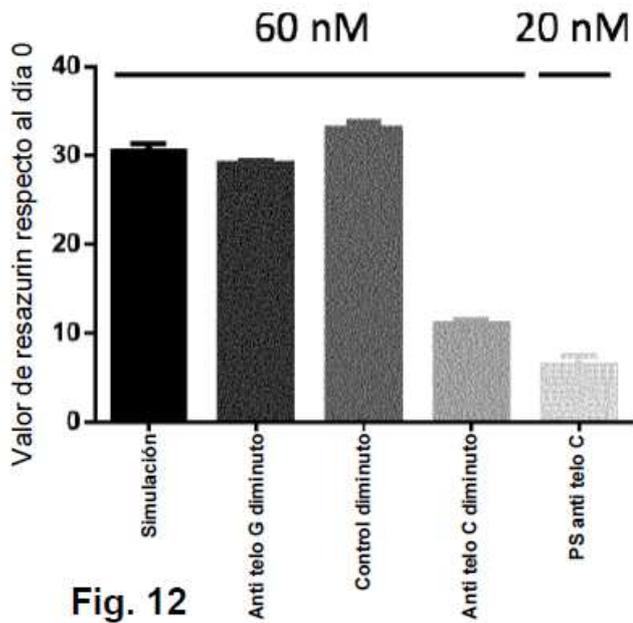


Fig. 12

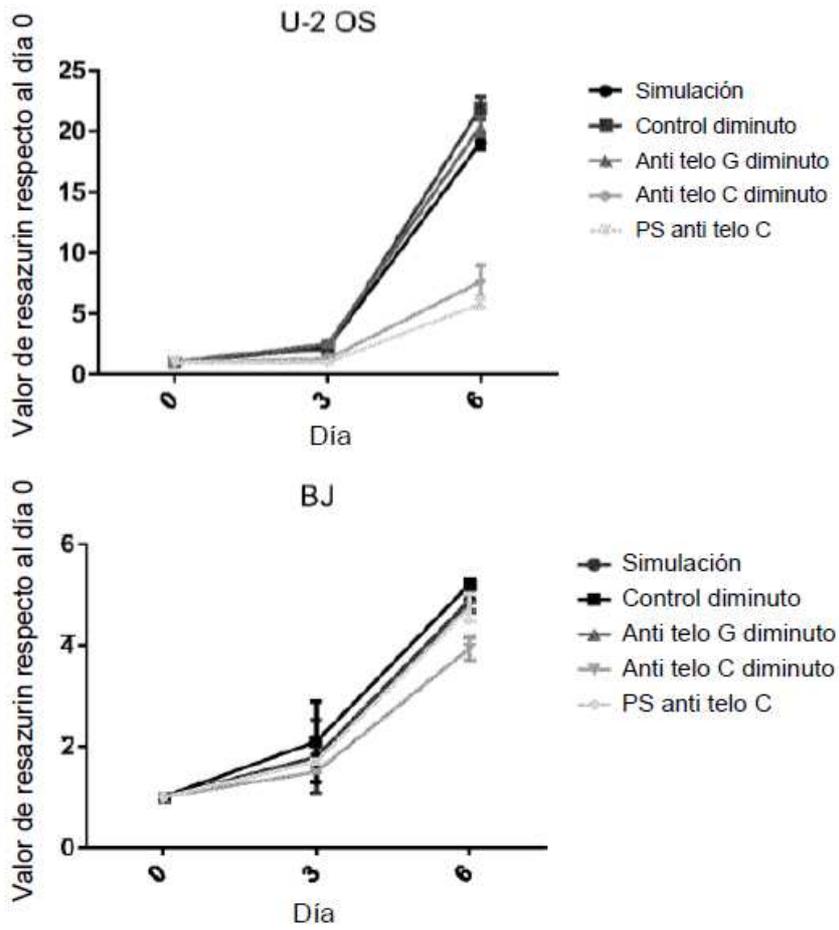


Fig. 13

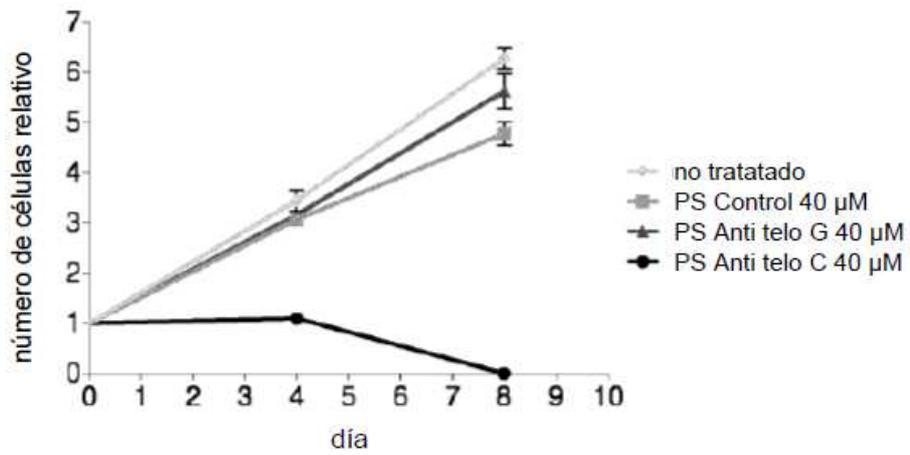
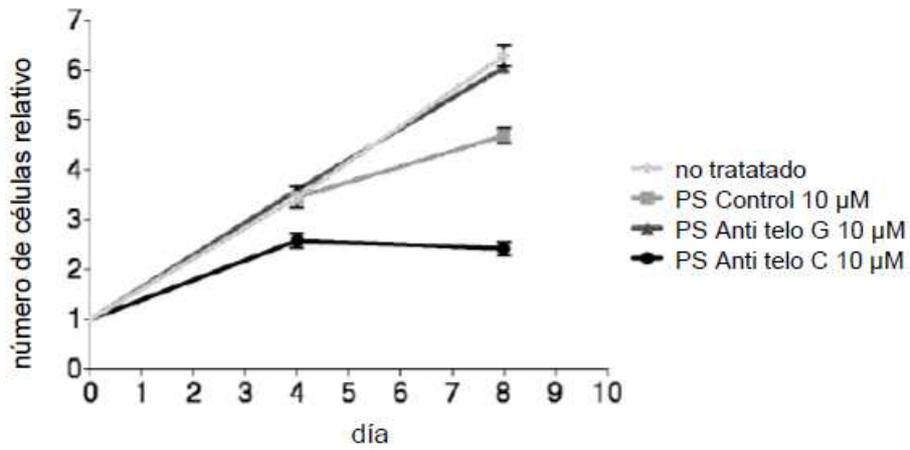


Fig. 14

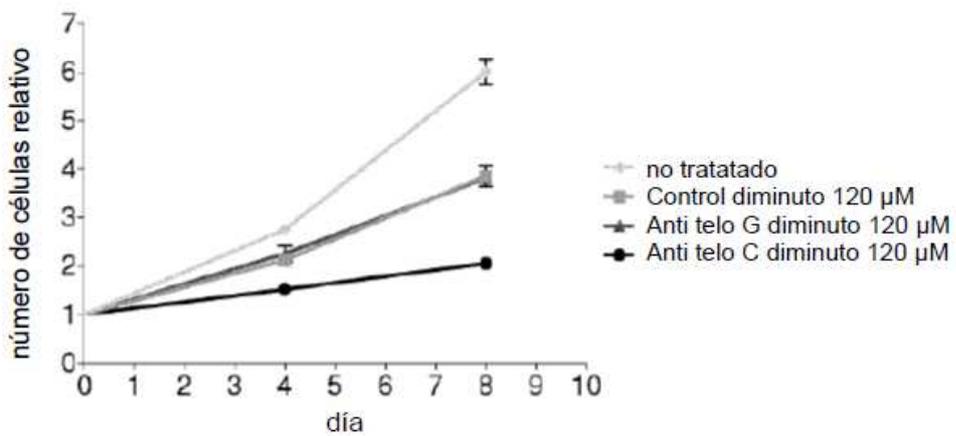


Fig. 15

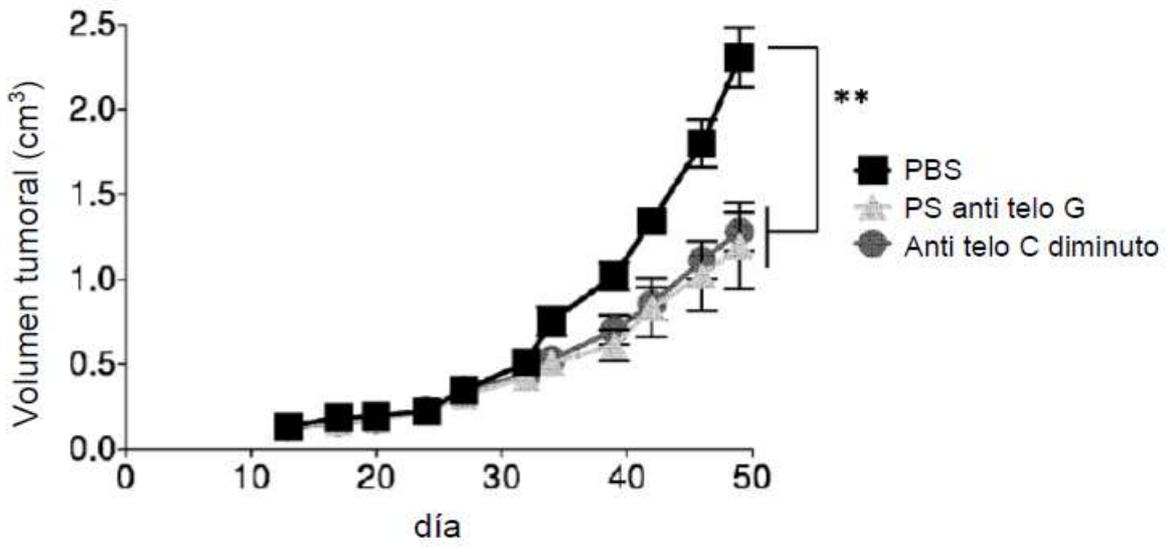


Fig. 16

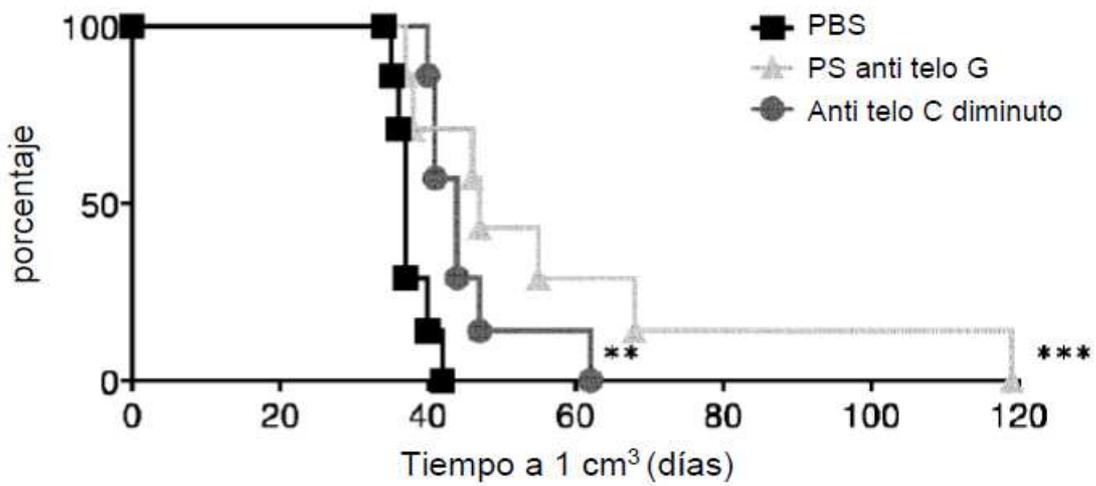


Fig. 17

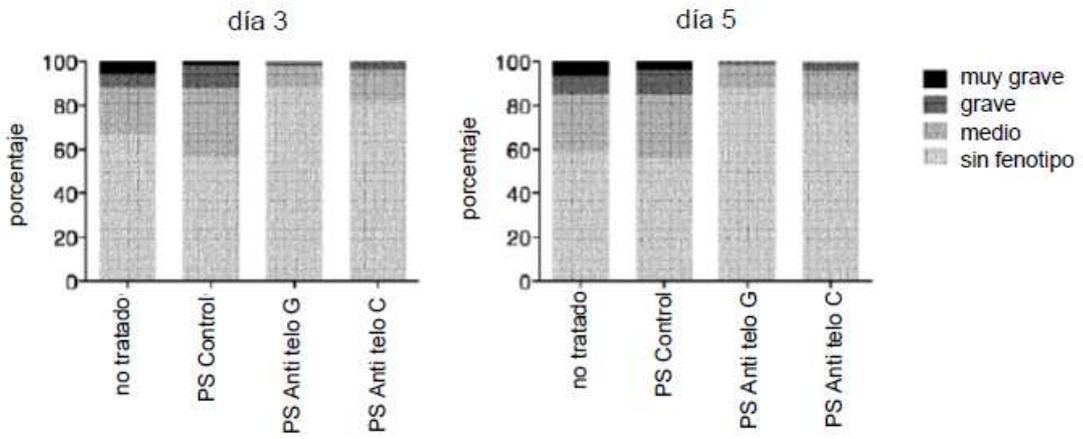


Fig. 18

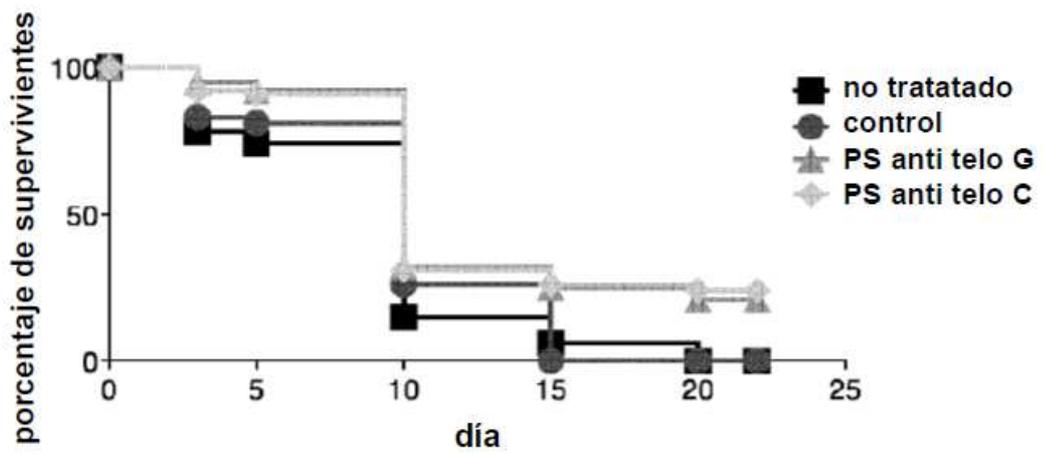


Fig. 19

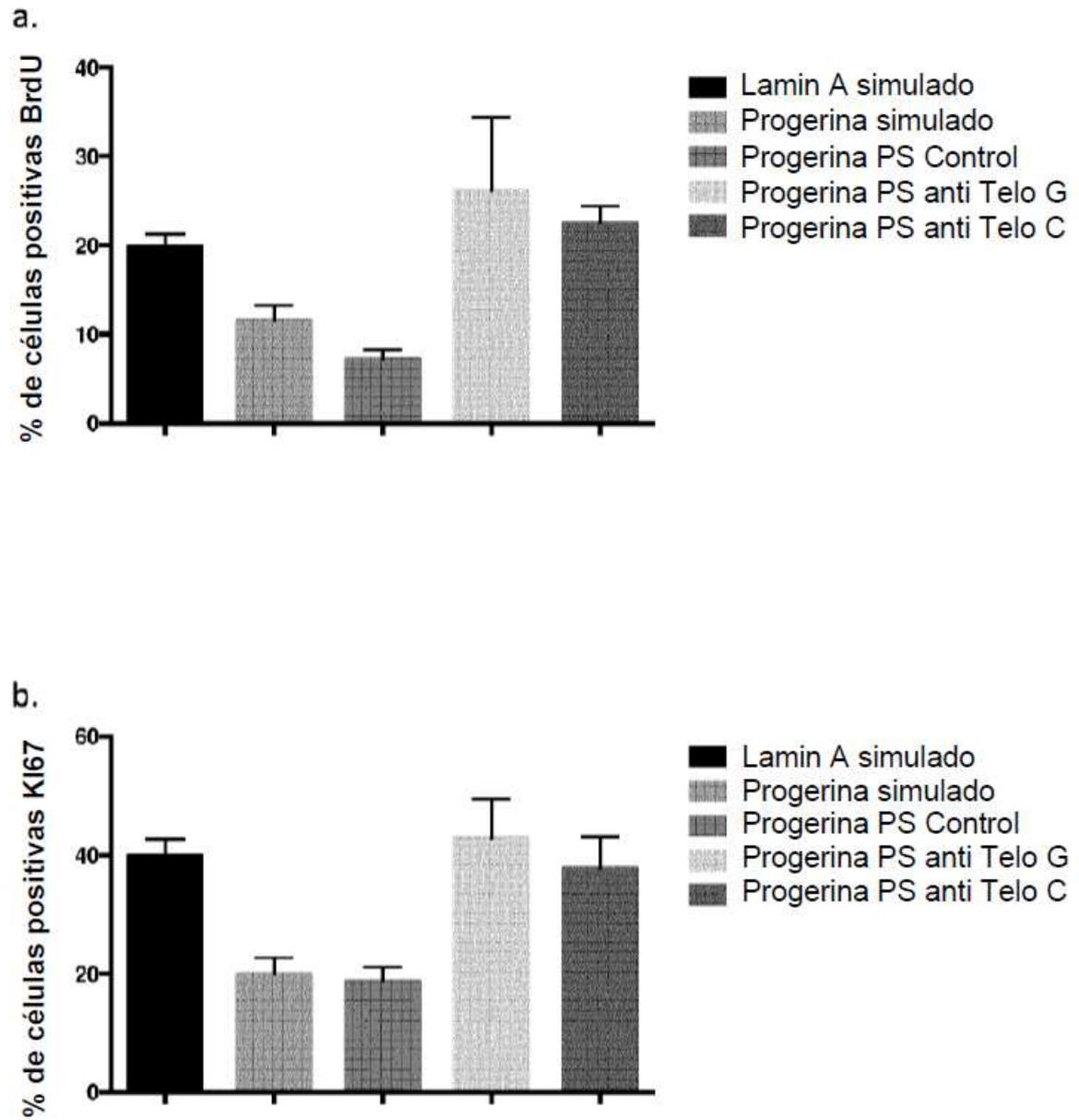


Fig. 20

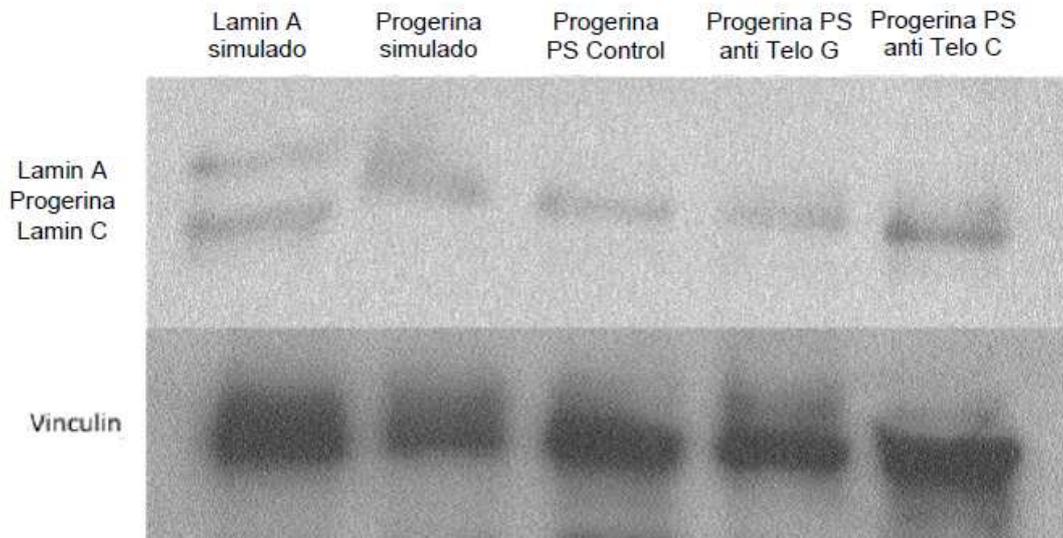


Fig. 21

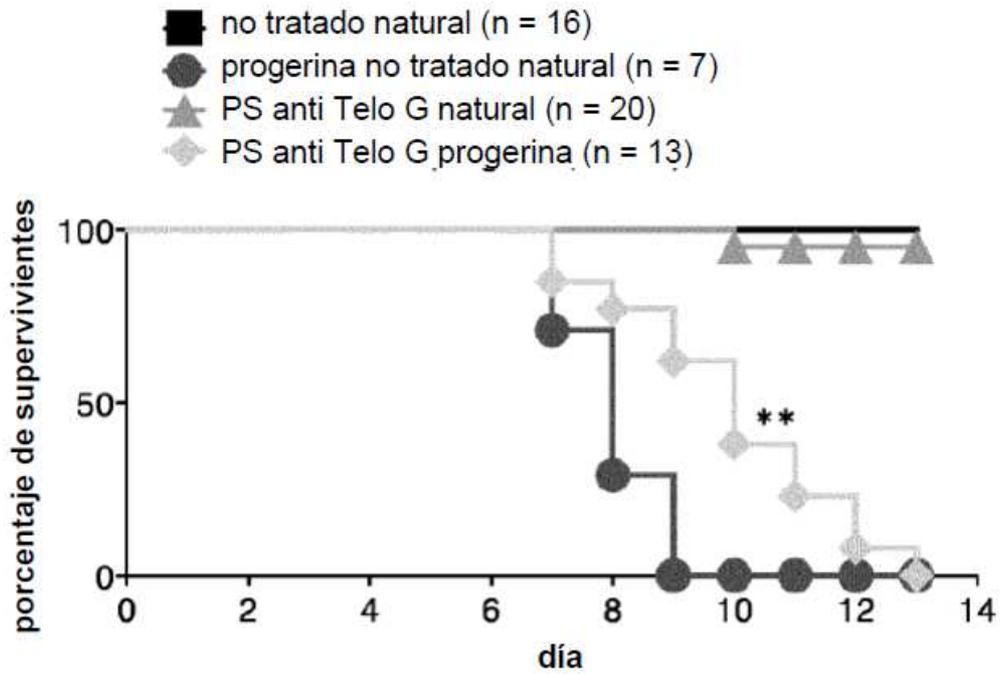


Fig. 22

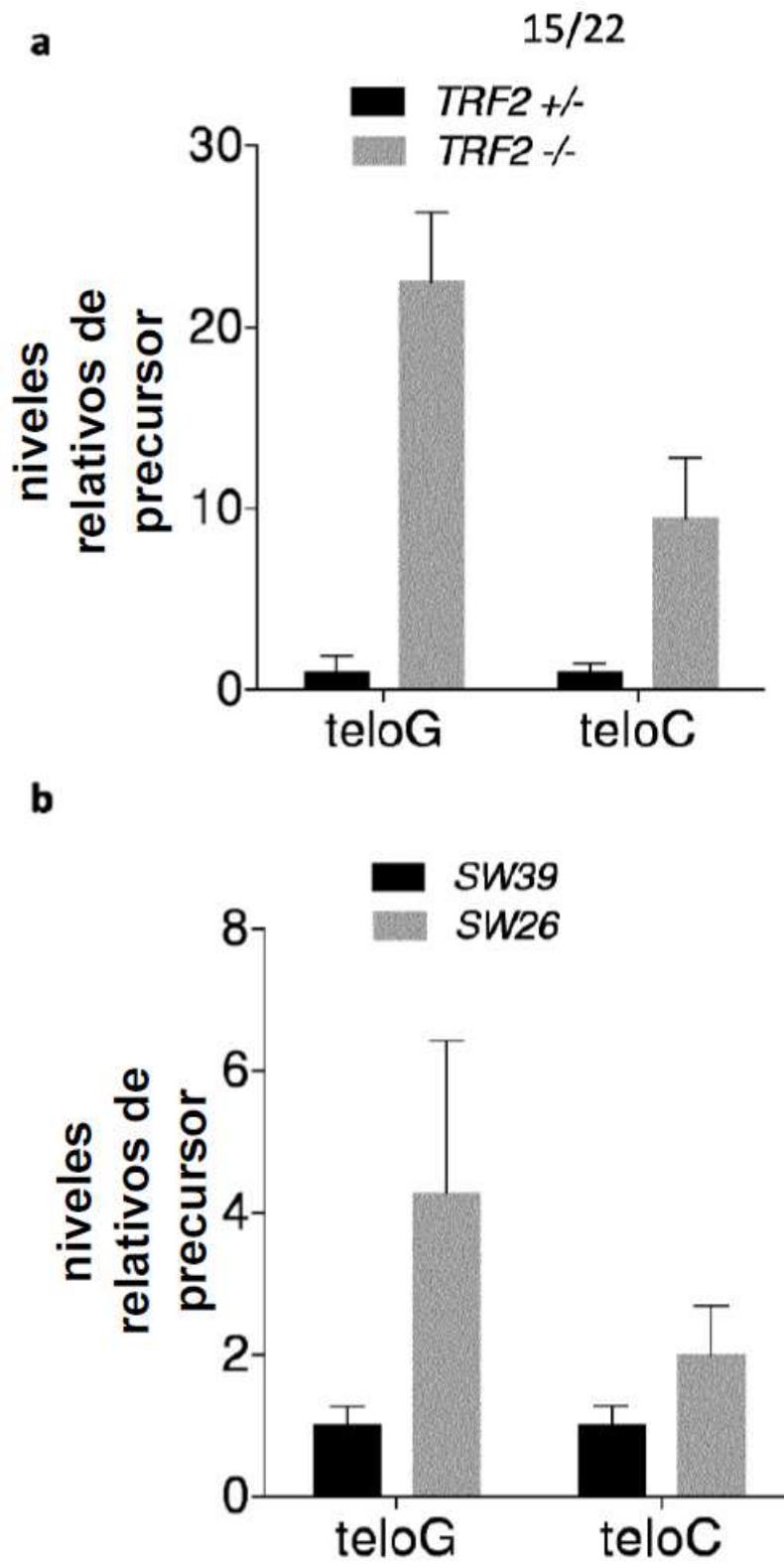


Fig. 23

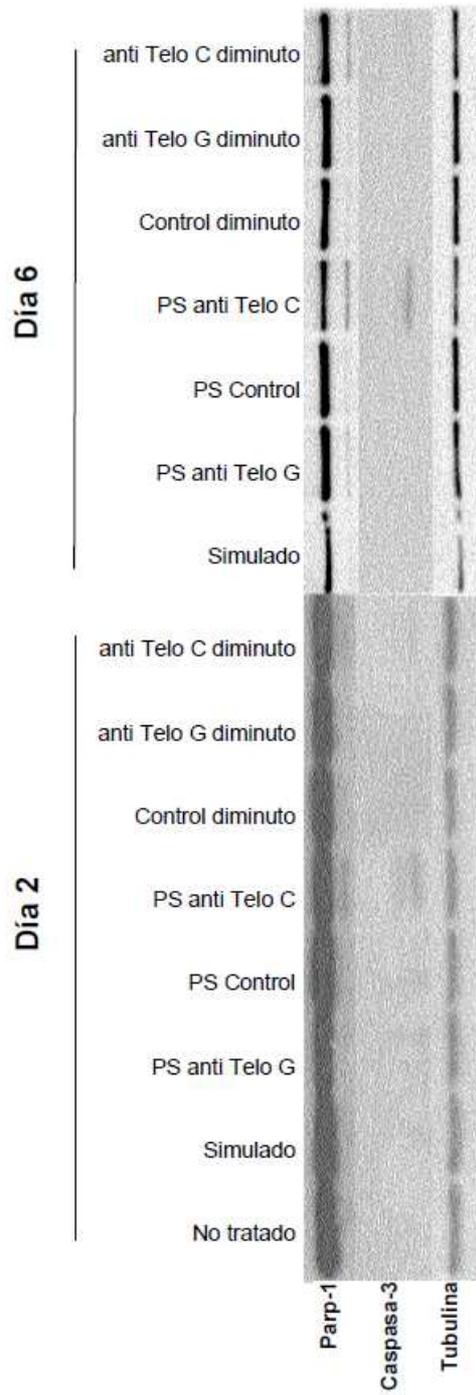


Fig. 24 (1/2)

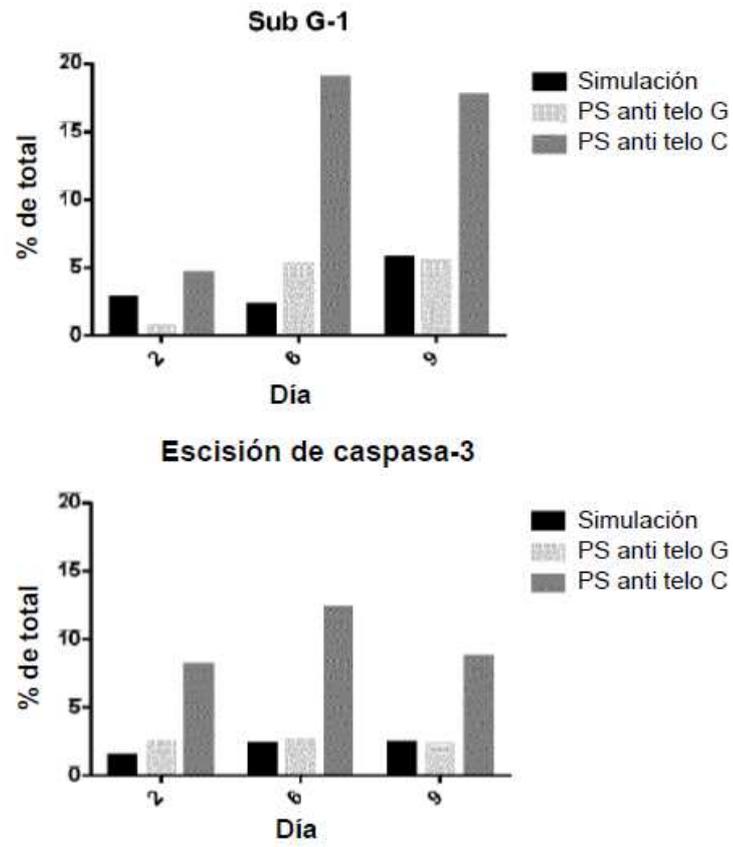


Fig. 24 (2/2)

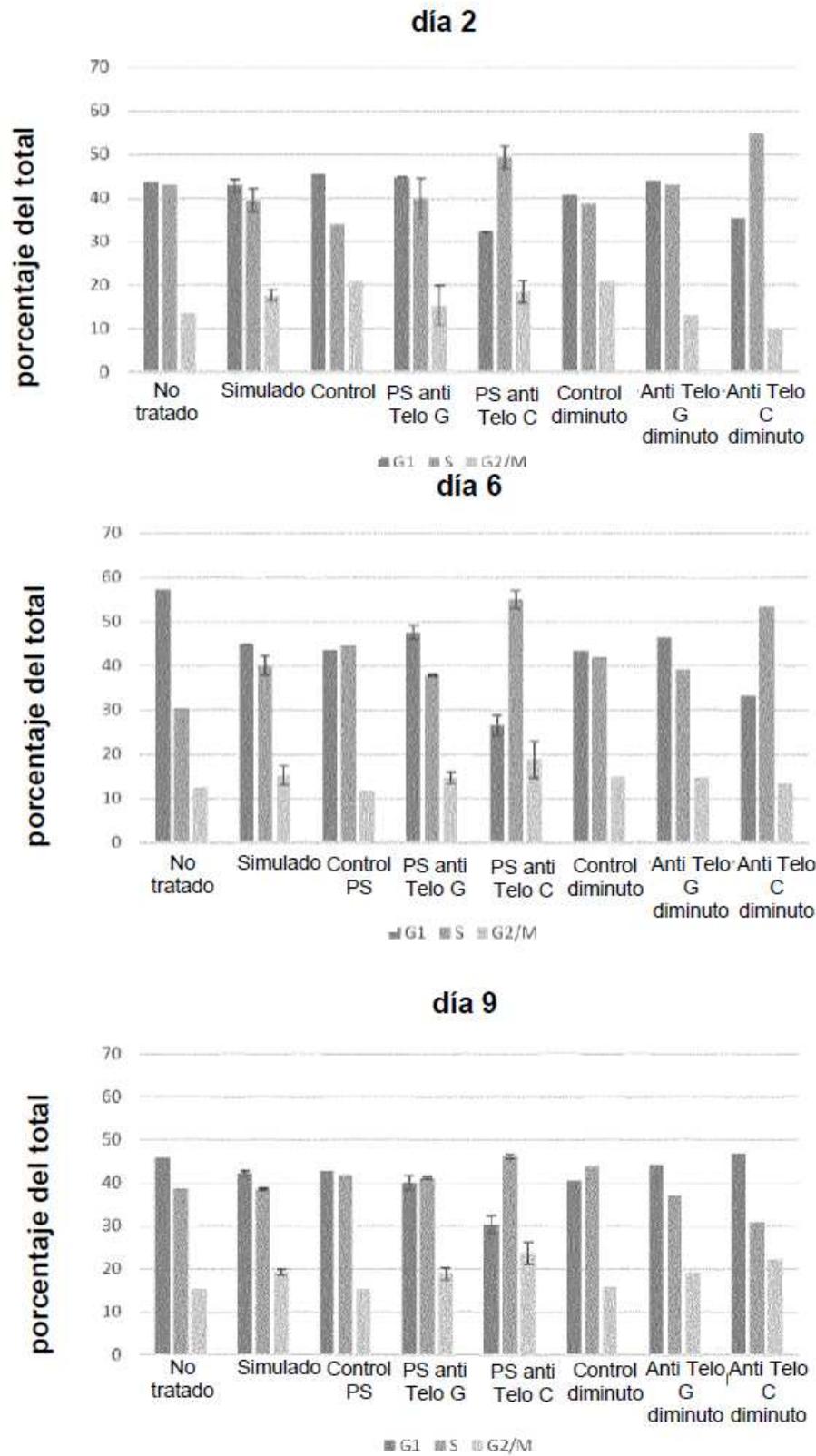


Fig. 25

Diminuto: 60 nM
PS: 20 nM

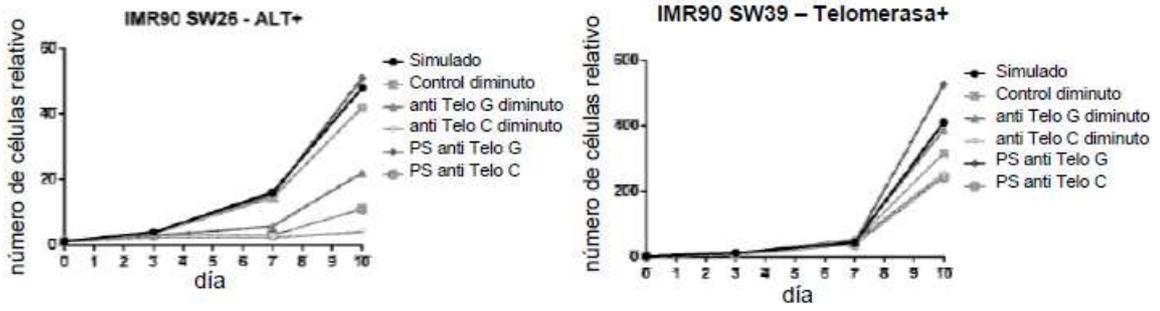


Fig. 26

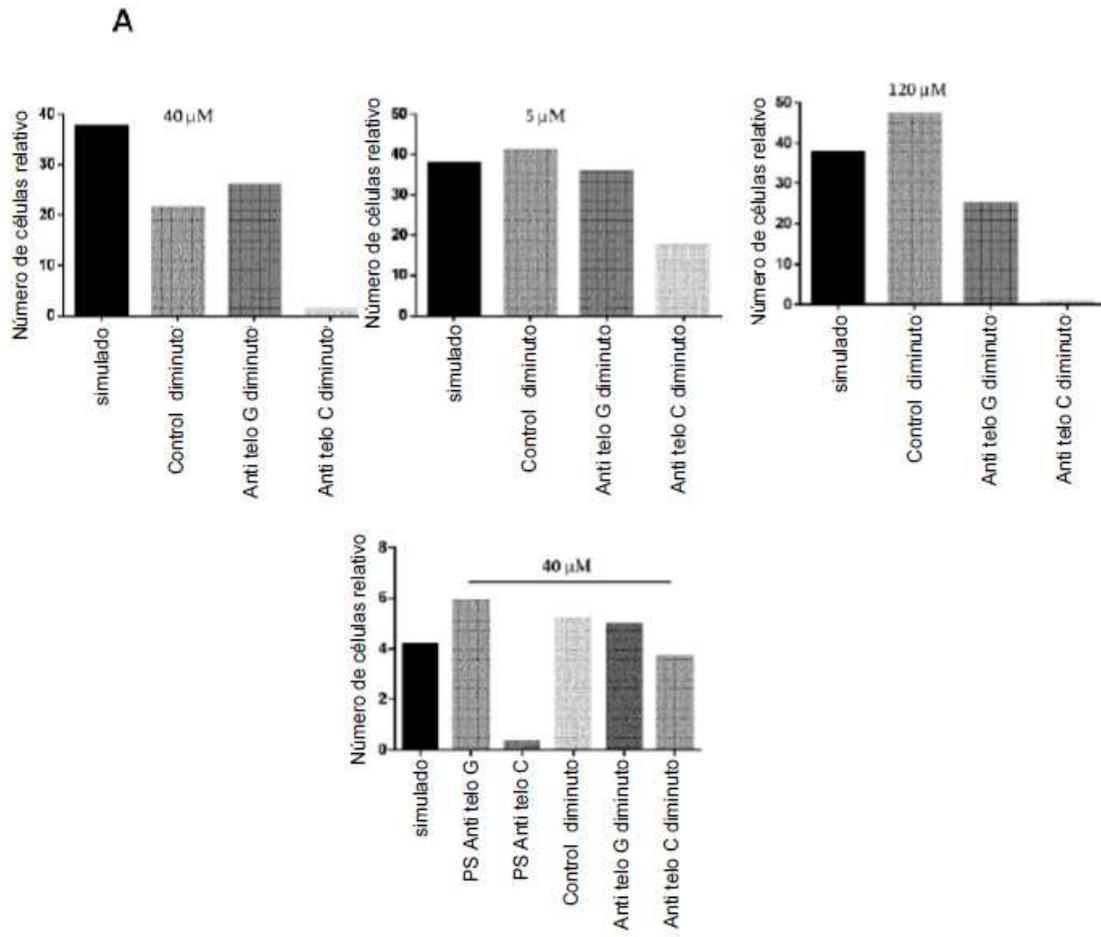


Fig. 27

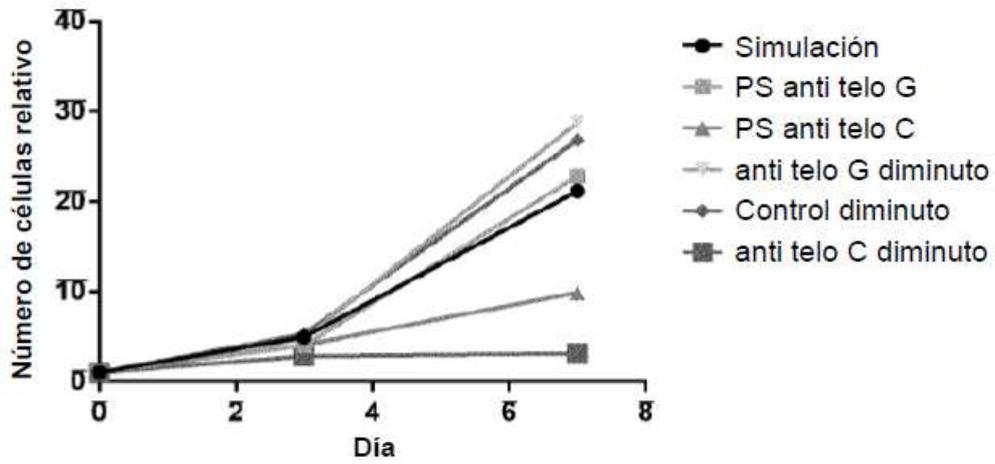


Fig. 28

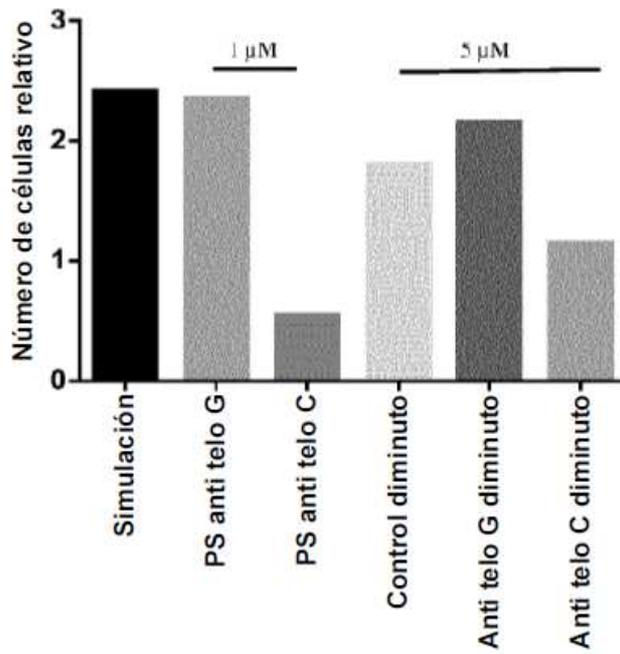


Fig. 29

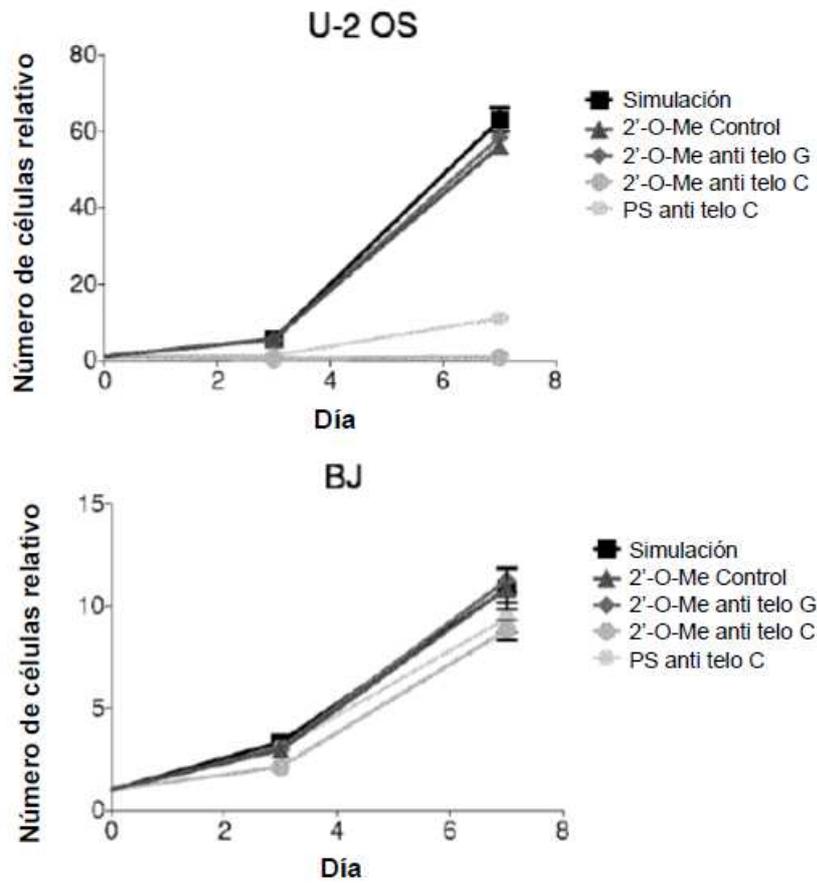


Fig. 30

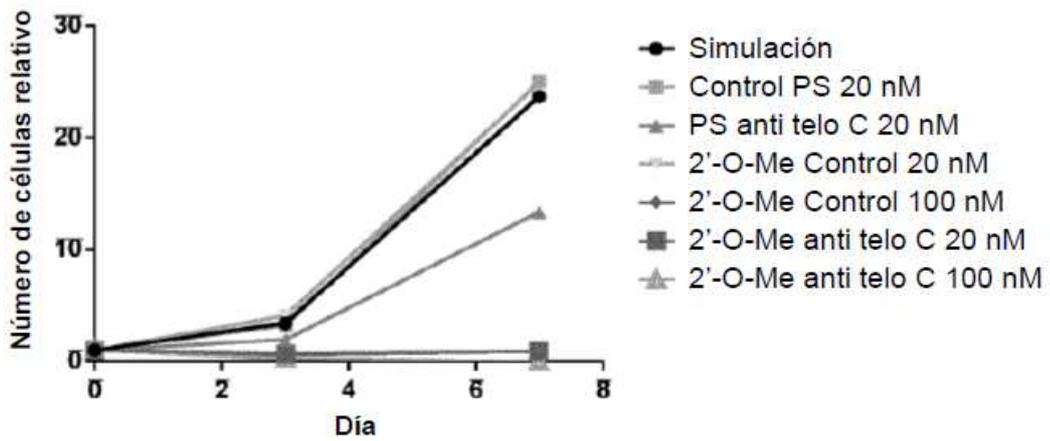


Fig. 31