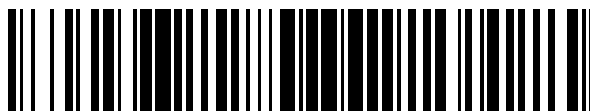


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 998**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

A61K 31/7084 (2006.01)

A61K 33/24 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2006 E 15161013 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2944646**

54 Título: **Análogos de oligonucleótidos que incorporan 5-aza-citosina en los mismos**

30 Prioridad:

29.09.2005 US 241799

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

16.09.2020

73 Titular/es:

**ASTEX PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
4420 Rosewood Drive, Suite 200
Pleasanton, CA 94588, US**

72 Inventor/es:

**PHIASIVONGSA, PASIT y
REDKAR, SANJEEV**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 782 998 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

Análogos de oligonucleótidos que incorporan 5-aza-citosina en los mismos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al diseño, a la síntesis y a la aplicación de análogos de oligonucleótidos que son útiles como agentes terapéuticos, diagnósticos así como reactivos de investigación. Se proporcionan análogos de nucleótidos que incorporan un análogo de citosina, 5-aza-citosina, en la secuencia oligonucleotídica, por ejemplo, en forma de 5-aza-2'-desoxicitidina o 5-aza-citidina. Dichos análogos pueden usarse para la modulación de la metilación del ADN, especialmente para la inhibición eficaz de la metilación de la citosina en la posición C-5, más específicamente usando como diana los islotes de CpG del genoma humano. Se proporcionan métodos para sintetizar estos análogos de oligonucleótidos y para modular la metilación de citosina en C-5. En particular, se proporcionan bloques de construcción de fosforamidita y oligonucleótidos que contienen decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina; D), islotes ricos en DpG (decitabina-fosfodiéster-enlace-guanosina) y derivados. También se proporcionan métodos para preparar, formular y administrar estos compuestos o composiciones como agentes terapéuticos a un hospedador que lo necesite.

20 Descripción de la técnica relacionada

25 Actualmente, la decitabina se está desarrollando como agente farmacéutico para el tratamiento de la leucemia mielógena crónica (LMC), del síndrome mielodisplásico (SMD), del cáncer de pulmón no microcítico (CPNMC), de la anemia de células falciformes, y de la leucemia mielógena aguda (LMA). Pueden distinguirse dos formas isoméricas de la decitabina. El anómero β es la forma activa, que se muestra en la Figura 1. La decitabina posee múltiples características farmacológicas. A nivel molecular, se incorpora en el ADN durante la fase S del ciclo celular. A nivel celular, la decitabina puede inducir la diferenciación celular y producir toxicidad hematológica. A pesar de tener una semivida *in vivo* corta, la decitabina tiene una excelente distribución tisular.

30 Una de las funciones de la decitabina es su capacidad para inhibir la metilación del ADN de manera específica y potente. La metilación del ADN es un efecto epigenético común a muchos sistemas. Esta modificación implica la modificación covalente de la citosina en la posición C-5 (la"). Los patrones de metilación se mantienen estables en los dinucleótidos CpG mediante una familia de ADN metiltransferasas que reconocen al ADN hemimetilado después de la replicación del ADN. Dentro de la célula, la decitabina se convierte en primer lugar a su forma activa, la 5-aza-desoxicitidina fosforilada, por medio de la desoxicitidina cinasa, que se sintetiza principalmente durante la fase S del ciclo celular. La afinidad de la decitabina por el sitio catalítico de la desoxicitidina cinasa es similar al sustrato natural, desoxicitidina (Momparker et al. 1985 *Mol. Pharmacol.* 30:287-299). Después de la conversión a su forma de trifosfato por medio de la desoxicitidina cinasa, la decitabina se incorpora en el ADN en replicación a una velocidad similar a la del sustrato natural, dCTP (Bouchard y Momparker 1983 *Mol. Pharmacol.* 24:109-114).

35 Las secuencias ricas en CpG de genes constitutivos están generalmente protegidas de la metilación en células normales. En células cancerosas, la hipermetilación aberrante en islas de CpG de regiones promotoras de genes supresores tumorales es uno de los sucesos más comunes asociados con la progresión del fenotipo tumorigénico. Cada clase de células diferenciadas tiene su propio patrón distinto de metilación. La incorporación de decitabina en la hebra de ADN tiene un efecto de hipometilación. Después de la duplicación cromosómica, para conservar este patrón de metilación, la 5-metilcitosina en la hebra parental sirve para dirigir la metilación en la hebra de ADN hermana complementaria. La sustitución del carbono en la posición C-5 de la citosina por nitrógeno interfiere con su proceso normal de metilación de ADN. El reemplazo de citosina por decitabina en un sitio de metilación específico produce una inactivación irreversible de las ADN metiltransferasas. La decitabina se comporta fielmente como un resto de citosina hasta que las enzimas ADN metiltransferasas intentan transferir un grupo metilo a las hebras de ADN hemimetiladas de las células hermanas. En esta etapa, la enzima ADN metiltransferasa se queda atrapada covalentemente en el ADN por la decitabina y ya no puede silenciar (metilar) restos adicionales de citosina (Juttermann et al. 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11797-11801). Este mecanismo de acción único de la decitabina permite que los genes silenciados (que antes estuvieron metilados) a partir de rondas previas de división celular puedan volver a expresarse. La trampa activa está presente en el ADN hemimetilado hasta 48 horas después del tratamiento con decitabina. Después de la posterior síntesis de ADN y división del ciclo celular, las hebras de progenie del ADN hemimetilado dan como resultado hebras que están completamente no metiladas en estos sitios (Jones P. 2001 *Nature* 409; 141, 143-4). Mediante la inhibición específica de las ADN metiltransferasas, la enzima necesaria para la metilación, puede revertirse la metilación aberrante de los genes supresores tumorales.

40 A pesar de su efecto antileucémico demostrado en la LMC, el SMD y la LMA, la aplicación potencial de la decitabina se ha visto impedida por la mielosupresión retardada y prolongada. Dosis menores de decitabina, administradas durante un periodo de tiempo más prolongado, han minimizado la mielosupresión hasta niveles manejables sin comprometer su capacidad para suprimir el cáncer mediante su efecto de hipometilación. A dosis mayores, la toxicidad asociada fue prohibitiva. Sin embargo, el tratamiento de tumores hematológicos y sólidos a las dosis

máximas admitidas de decitabina ha sido ineficaz. La causa de la mielosupresión no está clara. Es posible que ya que la decitabina se incorpora al azar y de manera extensiva en el ADN de las células en fase S, incluyendo las células de médula ósea que están implicadas en la hematopoyesis normal, el daño grave en el ADN debido a la inestabilidad de la decitabina da lugar a necrosis. Ya que la incorporación de decitabina no está restringida únicamente a las secuencias ricas en CpG, el ADN puede romperse debido a la inestabilidad de la decitabina, y necesitar reparación en numerosos sitios fuera de las islas de CpG.

La decitabina y la azacitidina son inestables en medio acuoso y sufren degradación hidrolítica. En medio ácido, la decitabina se hidroliza a temperatura ambiente en 5-azacitosina y 2-desoxirribosa. En medio neutro a temperatura ambiente, la apertura del anillo de triazina tiene lugar en la posición 6 para formar el derivado de formilo intermedio transitorio, que degrada adicionalmente al derivado de amidino-urea y al ácido fórmico (Piskala, A.; Synackova, M.; Tomankova, H.; Fiedler, P.; Zizkowsky, V. *Nucleic Acids Res.* 1978, 4, s109-s-113.). Esta hidrólisis en la posición 6 sucede en medios acuosos ácidos y básicos a velocidades aún mayores.

García describe cómo la incorporación de restos de 5-azacitosina en el AND conlleva una potente inhibición de la ADN metiltransferasa (R García et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 2001, 11, 369-378).

McIntosh describe la síntesis y caracterización de poli[d(G-z⁵C)], donde z⁵C es 5-azacitidina (L.P McIntosh et al., *Biochemistry*, 1985, 24, 4806-4814).

Eritja describe la preparación de derivados de decitabina que portan un grupo 2-(p-nitrofenil)etilo (R Eritja et al., *Nucleosides and Nucleotides*, 1997, 16, 1111-1114).

Zhenodarova describe metabolitos de nucleósido en la síntesis de enlaces internucleotídicos catalizada por ribonucleasas (S.M Zhenodarova et al., *Nukleazy: Biol. Rol. Prakt. Ispol'z.*, 1985, 25-8, USSR. Coden: 54IIAL).

El documento WO 89/09779 A1 describe un reactivo de tipo fosforamidito para la síntesis química de AND modificado.

A la vista de la inestabilidad química y la citotoxicidad asociada con la decitabina, existe una necesidad para desarrollar no solo derivados de decitabina más estables, sino también agentes hipometilantes superiores, donde la incorporación se localice en las islas de CpG tanto como sea posible o se logre la hipometilación sin afectar de manera significativa a la integridad del ADN.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, de fórmula general 5'-DpG-3' o 5'-GpD-3', en los que D es decitabina; p es un enlazador fosfo; y G es 2'-desoxiguanosina, para su uso en tratamiento de uno o más de los siguientes:

un tumor benigno seleccionado entre hemangiomas, adenoma hepatocelular, hemangioma cavernoso, hiperplasia nodular focal, neuromas acústicos, neurofibroma, adenoma del conducto biliar, cistanoma del conducto biliar, fibroma, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, hiperplasia regenerativa nodular, tracomas y granulomas piogénicos;

proliferación celular anormal debido a lesiones a tejidos corporales durante la cirugía, preferentemente cirugía articular, cirugía intestinal, o cicatrización de queloides;

una enfermedad que produce tejido fibrótico, preferentemente enfisema;

un trastorno del movimiento repetitivo, preferentemente el síndrome del túnel carpiano;

una respuesta proliferativa asociada con el trasplante de órganos; y

angiogénesis anormal, o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o anormal.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, de fórmula general 5'-DpG-3' o 5'-GpD-3', en el que D es decitabina; p es un enlazador fosfo; y G es desoxiguanosina, en la producción de un medicamento para tratar uno o más de los siguientes:

un tumor benigno seleccionado entre hemangiomas, adenoma hepatocelular, hemangioma cavernoso, hiperplasia nodular focal, neuromas acústicos, neurofibroma, adenoma del conducto biliar, cistanoma del conducto biliar, fibroma, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, hiperplasia regenerativa nodular, tracomas y granulomas piogénicos;

proliferación celular anormal debida a lesiones a tejidos corporales durante la cirugía, preferentemente cirugía articular, cirugía intestinal, o cicatrización de queloides;

una enfermedad que produce tejido fibrótico, preferentemente enfisema;

5

un trastorno del movimiento repetitivo, preferentemente el síndrome del túnel carpiano;

una respuesta proliferativa asociada con el trasplante de órganos; y

10

angiogénesis anormal, o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o anormal.

En otro aspecto más de la invención, proporcionado en el presente documento hay un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, de fórmula general 5'-DpG-3' o 5'-GpD-3', en el que D es decitabina; p es un enlazador fosfo; y G es desoxiguanosina, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con la metiación de ADN aberrante,

15

donde dicho análogo es para la administración en un régimen posológico que comprende un ciclo de tratamiento, comprendiendo dicho ciclo de tratamiento:

20

infusión intravenosa durante de 1 a 24 horas durante de 3 a 5 días por ciclo de tratamiento con una dosis de 0,1 a 1000 mg/m² al día.

La presente invención también proporciona una formulación que comprende:

25

- (i) un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, de fórmula general 5'-DpG-3' o 5'-GpD-3' donde D es decitabina; p es un enlazador fosfo; y G es desoxiguanosina; y
- (ii) una vacuna contra el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

30

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención mediante referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los que:

35

La Figura 1 muestra la estructura de la decitabina, D (1a), citosina, C (1a'), y 5-metil citosina, mC (1a").

La Figura 2A ilustra ejemplos de bloques de construcción de fosforamidita de decitabina.

40

La Figura 2B ilustra el bloque de construcción 1d de fosforamidita de decitabina, donde R1 = fenoxiacetilo.

La Figura 3A ilustra derivados de decitabina protegidos en 3' y 5'-O y unidos en 3' a vidrio de poro controlado.

45

La Figura 3B ilustra a decitabina protegida enlazada en 3' sobre un soporte de vidrio de poro controlado.

La Figura 4 ilustra ejemplos de derivados de decitabina protegidos en 3'-O.

La Figura 5 ilustra un ciclo convencional de síntesis de oligonucleótidos.

50

La Figura 6A muestra esquemas de síntesis de dinucleótidos y tetranucleótidos de GpD, donde X⁺ es un contraión.

La Figura 6B ilustra un modelo de ciclo de síntesis de dinucleótido de GpD (2a) y de tetranucleótido de DpGpGpD (3b).

55

La Figura 7 ilustra el tetranucleótido de DpGpGpD.

La Figura 8 muestra esquemas de síntesis de dinucleótidos y tetranucleótidos de GpD,

60

La Figura 9 ilustra al trinucleótido de GpDpG y al tetranucleótido de GpDpDpG.

La Figura 10 ilustra a la decitabina protegida unida en 3' sobre poli(etilenglicol).

65

La Figura 11 muestra esquemas de síntesis de un dinucleótido de GpD protegido en 3' y 5'-O.

La Figura 12 muestra esquemas de síntesis de un dinucleótido de DpG protegido en 3' y 5'-O.

- La Figura 13 ilustra dinucleótidos de GpD y DpG con enlace fosforotioato resistente a nucleasas.
- La Figura 14 ilustra tetranucleótidos de GpDpGpD y DpGpGpD con enlace fosforotioato resistente a nucleasas.
- 5 La Figura 15 ilustra tetranucleótidos de DpGpDpG y GpDpDpG con enlace fosforotioato resistente a nucleasas.
- La Figura 16 ilustra dinucleótidos de GpD y DpG con grupos 4-amino resistentes a citidina desaminasa.
- 10 La Figura 17 ilustra dinucleótidos de GpD y DpG con grupos 4-amino resistentes a citidina desaminasa y enlace fosforotioato resistente a nucleasas.
- La Figura 18 ilustra tetranucleótidos de GpDpGpD y DpGpGpD con grupos 4-amino resistentes a citidina desaminasa.
- 15 La Figura 19 ilustra tetranucleótidos de GpDpGpD y DpGpGpD con grupos 4-amino resistentes a citidina desaminasa y enlace fosforotioato resistente a nucleasas.
- La Figura 20 ilustra dinucleótidos Prot-O-GpD-O-Prot y Prot-O-DpG-O-Prot con grupos 4-amino resistentes a citidina desaminasa.
- 20 La Figura 21 ilustra dinucleótidos Prot-O-GpD-O-Prot y Prot-O-DpG-O-Prot con grupos 4-amino resistentes a citidina desaminasa y enlace fosforotioato resistente a nucleasas.
- La Figura 22 ilustra tetranucleótidos de DpGpDpG y GpDpDpG con grupos 4-amino resistentes a citidina desaminasa.
- 25 La Figura 23 ilustra tetranucleótidos de DpGpDpG y GpDpDpG con grupos 4-amino resistentes a citidina desaminasa y enlace fosforotioato resistente a nucleasas.
- 30 La Figura 24A ilustra islotes de -DpG- con estructuras fosfodiéster naturales o estructuras modificadas.
- La Figura 24B ilustra una estructura peptídica de islote de -DpG-.
- La Figura 25 ilustra esquemáticamente un ensayo de GFP basado en células para metilación de ADN. El panel a) muestra células de control; y el panel b) células tratadas con oligonucleótidos de la presente invención y que expresan GFP.
- 35 La Figura 26 lista ejemplos de análogos de oligonucleótidos de la invención que se dirigen específicamente a la región promotora de P15, BRAC1 o P16, donde D puede ser decitabina o análogos de decitabina y px = p para enlace de fosfato natural, px = ps para enlace fosforotioato, px = bp para boranofosfato, px = mp enlace metilfosfonato.
- 40 La Figura 27 lista la secuencia de la región promotora de P15 y ejemplos de segmentos de la misma, basándose en qué análogos de oligonucleótidos ricos en DpG y GpD pueden prepararse.
- 45 La Figura 28 lista la secuencia de la región promotora de P16 y ejemplos de segmentos de la misma, basándose en qué análogos de oligonucleótidos ricos en DpG y GpD pueden prepararse.
- La Figura 29 lista la secuencia de la región promotora de BRCA1 y ejemplos de segmentos de la misma, basándose en qué análogos de oligonucleótidos ricos en DpG y GpD pueden prepararse.
- 50 La Figura 30 es un espectro de masas de una sal de trietilamonio de GpD (2a).
- La Figura 31 es un espectro de masas de una sal de trietilamonio de DpG (2b).
- 55 La Figura 32 es un espectro de masas de una sal de trietilamonio de DpGpGpD (3b).
- La Figura 33 es un espectro de masas de una sal de trietilamonio de GpDpG (3c').
- 60 La Figura 34 es un espectro de masas de una sal de trietilamonio de DpGpDpG (3c).
- La Figura 35 es un espectro de masas de una sal de trietilamonio de DpG (2b) unida por fosforotioato.
- La Figura 36 es un espectro de masas de una sal de sodio de DpG (2b).
- 65 La Figura 37 es un espectro de masas de una sal de trietilamonio de HEG-DpG (2d).

La Figura 38 es un espectro de masas de un bloque de construcción de fosforamidita de decitabina (1d; R₁ = fenoxiacetilo).

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona análogos de oligonucleótidos que incorporan un análogo de citosina, 5-aza-citosina, en la secuencia oligonucleotídica, por ejemplo, en forma de 5-aza-2'-desoxicitidina (también conocida como decitabina) o de 5-aza-citidina (5-azaC). Se cree que la incorporación de uno o más restos de 5-aza-citosina en un oligonucleótido podría tener un efecto hipometilante en el ADN ya que el reemplazo de la citosina por decitabina en un sitio específico de metilación produce una inactivación irreversible de la ADN metiltransferasa. Preferentemente, la decitabina se incorpora en el oligonucleótido adyacente en 5' a un resto de guanina para formar un islote de DpG para dirigirse más específicamente a los islotes de CpG del genoma humano.

15 La invención se dirige a superar toxicidades potenciales asociadas con agentes hipometilantes convencionales, tales como decitabina y 5-aza-citidina. En comparación con las formas de nucleósido libres, que se incorporan aleatoria y extensivamente en el genoma completo, los compuestos de la invención podrían actuar como cebadores y se incorporan principalmente en las islas ricas en CpG del ADN durante la replicación. Preferentemente, los compuestos de la invención actúan como cebadores y se incorporan específicamente en las islas ricas en CpG de los promotores de genes terapéutica o diagnósticamente importantes, tales como los genes supresores de tumores. Los compuestos de la invención podrían formar hebras temporalmente hemimetiladas con la hebra parental y funcionar como la trampa activa de ADN metiltransferasa sin estar incorporadas. Los compuestos de la invención también podrían ocupar directamente y atrapar a las ADN metiltransferasas sin incorporarse en el genoma. Ya que la modificación de ADN se localiza en las islas ricas en CpG en las regiones promotoras de genes supresores tumorales, cuando se incorporan los compuestos de la invención, la trampa activa se sitúa de manera óptima y la estabilidad general del genoma mayor no queda comprometida.

25 Al modular la metilación del ADN, los compuestos de la invención pueden usarse como agentes terapéuticos, diagnósticos así como reactivos de investigación, especialmente en las áreas del cáncer y de los trastornos hematológicos. El silenciamiento transcripcional aberrante de una serie de genes, tales como genes supresores de tumores, está directamente relacionado con la patogénesis del cáncer y otras enfermedades. Debido a la metilación de los genes relacionados con el cáncer, se suprime o se silencia completamente la expresión de estos genes. Mientras tanto, la expresión de estos genes es necesaria para la inducción de la detención del crecimiento, la diferenciación, y/o la muerte celular apoptótica de células transformadas. La inacción de estos genes en las células transformadas da lugar a una proliferación descontrolada de estas células, que con el tiempo dan como resultado un cáncer. Por lo tanto, al usar los compuestos de la invención para atrapar de manera activa a la ADN metiltransferasa directamente y sin incorporarse en el genoma o incorporado en las islas ricas en CpG de estos genes, puede reactivarse la transcripción de los genes mediante la inhibición de la metilación de los promotores, dando como resultado la supresión de la proliferación de células cancerosas.

40 Los compuestos de la presente invención también pueden ser útiles para investigación y diagnóstico, debido a que algunas realizaciones de los compuestos de la invención pueden hibridar a una región 5' no traducida o a una secuencia promotora de un gen, permitiendo que se construyan fácilmente ensayos de tipo sándwich y otros para explotar este hecho. La hibridación de los análogos de oligonucleótidos de la invención con la secuencia promotora puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir conjugación o unión no covalente de una enzima al análogo de oligonucleótido, el radiomarcado del análogo de oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para modular la actividad del promotor del gen en una muestra.

50 La presente invención también proporciona métodos para sintetizar los análogos de oligonucleótidos y para modular la metilación de citosina en C-5. En particular, se proporcionan bloques de construcción de fosforamidita y oligonucleótidos que contienen decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina; D), islotes ricos en DpG (decitabina-fosfodiéster-enlace-guanosina) y derivados. También se proporcionan métodos para preparar, formular y administrar estos compuestos o composiciones como agentes terapéuticos a un hospedador que lo necesite. Los compuestos de la invención, los métodos de síntesis, la formulación de composiciones farmacéuticas, la preparación de envases y kits y el uso de los compuestos o composiciones para tratar enfermedades o afecciones se describen en detalle a continuación.

1. Análogos de oligonucleótidos de la presente invención

60 El análogo de oligonucleótido de la presente invención se describe en el sumario de la invención y las reivindicaciones adjuntas.

65 El gen es preferentemente un gen de mamífero, y más preferentemente un gen humano, y lo más preferentemente un gen supresor tumoral humano. Los ejemplos del gen humano incluyen, pero sin limitación, VHL (el gen de Von Hippo Landau implicado en el carcinoma de células renales); P16/INK4A (implicado en linfoma); E-cadherina (implicado en la metástasis del cáncer de mama, de tiroides, y gástrico); hMLH1 (implicado en la reparación de ADN

en cáncer de colon, gástrico, y de endometrio); BRCA1 (implicado en la reparación del ADN en el cáncer de mama y ovario); LKB1 (implicado en el cáncer de colon y de mama); P15/INK4B (implicado en leucemia, tal como LMA y LLA); ER (receptor de estrógenos, implicado en el cáncer de mama, de colon y leucemia); O6-MGMT (implicado en la reparación del ADN en el cáncer de cerebro, de colon, de pulmón y en linfoma); GST-pi (implicado en el cáncer de mama, de próstata, y renal); TIMP-3 (metaloproteasa tisular, implicada en la metástasis del cáncer de colon, renal y de cerebro); DAPK1 (DAP cinasa, implicada en la apoptosis del células del linfoma de células B); P73 (implicado en la apoptosis de células de linfomas); AR (receptor de andrógenos, implicado en el cáncer de próstata); RAR-beta (receptor de ácido retinoico beta, implicado en el cáncer de próstata); receptor de endotelina B (implicado en el cáncer de próstata); Rb (implicado en la regulación del ciclo celular del retinoblastoma); P14ARF (implicado en la regulación del ciclo celular); RASSF1 (implicado en la transducción de señales); APC (implicado en la transducción de señales); caspasa-8 (implicada en la apoptosis); TERT (implicado en la senescencia); TERC (implicado en la senescencia); TMS-1 (implicado en la apoptosis); SOCS-1 (implicado en la respuesta a factores de crecimiento del hepatocarcinoma); PITX2 (hepatocarcinoma, cáncer de mama); MINT1; MINT2; GPR37; SDC4; MYOD1; MDR1; THBS1; PTC1; y pMDR1, tal como se describen en Santini et al. (2001) Ann. of Intern. Med. 134:573-586. Las secuencias nucleotídicas de estos genes pueden obtenerse de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés, Centro Nacional para Información de Biotecnología).

A modo de ejemplo, las secuencias promotoras de los genes supresores de tumores, p15, p16, y BRCA1, se muestran en la Figura 27, 28, y 29, respectivamente. Los ejemplos de análogos de oligonucleótidos con al menos un 75 % de homología de secuencia con un segmento de p15, p16, y BRCA1 se muestran en la Figura 27, 28, y 29, respectivamente.

Los expertos en el campo de los ácidos nucleicos apreciarán que cuanto mayor sea el grado de homología de secuencia de un polinucleótido de ensayo con su polinucleótido diana, el polinucleótido de ensayo podrá permanecer hibridado al polinucleótido diana con una mayor condición de rigurosidad. Por lo tanto, los análogos de oligonucleótidos de la presente invención que se diseñan para dirigirse a un gen específico con aquellos análogos de oligonucleótidos que hibridan con el gen diana en condiciones de rigurosidad de muy baja a muy alta.

Otro ejemplo no limitante más de condiciones de rigurosidad alta incluye un lavado final a 65 °C en tampón acuoso que contiene NaCl 30 mM y 0,05 % de SDS. Otro ejemplo de condiciones de rigurosidad alta es la hibridación en 7 % de SDS, NaPO₄ 0,5 M, pH 7, EDTA 1 mM a 50 °C, por ejemplo, durante una noche, seguido por uno o más lavados con una solución de SDS al 1 % a 42 °C. Aunque los lavados de rigurosidad elevada pueden permitir un emparejamiento erróneo de un 5 % o menos, condiciones de rigurosidad reducida o baja pueden permitir hasta un 20 % de emparejamiento erróneo de nucleótidos. La hibridación a rigurosidad baja se puede lograr como se ha indicado anteriormente, pero utilizando condiciones de formamida más bajas, temperaturas más bajas y/o concentraciones de sales más bajas, así como también un tiempo de periodos de incubación más prolongado.

En una realización preferida, el análogo de oligonucleótido es capaz de hibridarse con el gen diana en condiciones de rigurosidad baja. En una realización más preferida, el análogo de oligonucleótido es capaz de hibridarse con el gen diana en condiciones de rigurosidad media. En la realización más preferida, el análogo de oligonucleótido es capaz de hibridarse con el gen diana en condiciones de rigurosidad elevada.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona un análogo de oligonucleótido que se une a un sitio alostérico en la ADN metiltransferasa e inhibe de esta manera la ADN metiltransferasa. La inhibición de la ADN metiltransferasa previene la metilación del ADN y de esta manera trata el trastorno asociado con la metilación de ADN aberrante, tal como cáncer y trastornos hematológicos.

En una realización, el análogo de oligonucleótido tiene una secuencia de

5'-CTGGATCCTTGCCCCGCCCTTGAATTCCC-3' (SEC ID NO:25);

5'-GGGAATTCAAATGACGTCAAAGGATCCAG-3' (SEC ID NO:26);

5'-CCTACCCACCCTGGATCCTTGCCCCGCCCTTGAATCCCAA

CCCTCCAC-3' (SEC ID NO:27);

5'-ATCCTTGCCCCGCCCTTGAAT-3' (SEC ID NO:28); o

5'-TTGCCCCGCCCTT (SEC ID NO:29), donde al menos uno de los restos de citosina en las SEC ID NOs: 25-28 está sustituido con 5-aza-citosina. Por ejemplo, el análogo de oligonucleótido puede ser

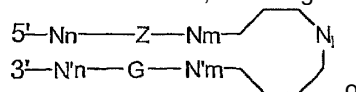
5'-CTGGATCCTTGCCCDGCCCTTGAATTCCC-3' (SEC ID NO:30)

donde uno de los 14 restos de citosina en la SEQ ID NO:25 en la posición nucleotídica 15 está sustituido con 5-aza-citosina. Otros ejemplos de oligonucleótidos que se unen a la ADN metiltransferasa se pueden modificar de acuerdo

con la presente invención sustituyendo al menos uno de los restos de citosina se pueden encontrar en el documento WO 99/12027, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Los ensayos para estudiar la actividad de los análogos de oligonucleótido de la presente invención en la unión y actividad inhibidora de la ADN metiltransferasa también se pueden encontrar en el documento WO 99/12027.

5 En otro aspecto más de la invención, se proporciona un análogo de oligonucleótido que tiene una longitud de al menos 6 nucleótidos, tiene al menos una 5-aza-citosina como un resto de base y adopta una conformación de horquilla a temperatura ambiente, tal como 20-25 °C, en solución acuosa, tal como agua, solución salina o tampón que comprende HEPES 20 mM (pH 7), 12 % de glicerol, EDTA 1 mM, ditioneitol 4 mM, 0,1 % de Nonidet P-40 y MgCl₂ 3 mM. Se cree que al adoptar una configuración de horquilla, el análogo de oligonucleótido mimetiza mejor el sustrato de ADN bicatenario para la ADN metiltransferasa que un oligonucleótido monocatenario, y de esta manera inhibe la actividad de la ADN metiltransferasa más eficazmente.

En una realización, el análogo de oligonucleótido tiene la siguiente estructura secundaria general:



20 En cualquiera de las realizaciones anteriores, en el enlace entre los restos de Z y G o entre cualesquiera dos de los restos de base en el análogo de oligonucleótido es preferentemente un enlace fosfodiéster en el azúcar. Preferentemente, el enlace es un enlace fosfodiéster a través de la 2'-desoxirribosa o de la ribosa, como en la estructura de fosfodiéster del azúcar natural en el ADN y ARN, respectivamente. Opcionalmente, para potenciar la resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*, el enlace natural fosfodiéster -O-P(=O)(O⁻)-O-CH₂- se puede modificar para que sea un enlace fosforotioato -O-P(=O)(S⁻)-O-CH₂-, boronofosfato o un enlace metilfosfonato; el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa puede modificarse para que sea un grupo 2'-metoxi, un grupo 2'-metoxietilo, o un grupo 2'-fluoro. Los ejemplos de dichos análogos de oligonucleótidos con estructuras no naturales se muestran en la Figura 24A, donde la decitabina se une a la guanosina a través de una estructura de fosfato de ribosa. También opcionalmente, la estructura de fosfodiéster del azúcar natural puede reemplazarse con una estructura de nucleótido de proteína (APN) donde la estructura se produce mediante la repetición de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina mediante enlaces peptídicos. Un ejemplo de dicho análogo de oligonucleótido con estructura de APN se muestra en la Figura 24B, donde la 5-aza-citosina se une a la guanina mediante una estructura de APN. Otros tipos de enlaces para oligonucleótidos diseñados para que sean más resistentes a la degradación por nucleasas que los naturales se describen en las patentes de EE.UU. n.º 6.900.540 y US 6.900.301.

35 Los análogos de oligonucleótidos de la presente invención pueden ser aquellos aislados a partir de fuentes biológicas, tales como tejidos, células y fluidos corporales, y preferentemente purificados hasta un grado de pureza sustancial, más preferentemente de al menos un 80 % de pureza, y lo más preferentemente del 95 % de pureza. Los análogos de oligonucleótidos también pueden ser aquellos sintéticos que son oligonucleótidos de origen no natural que comprenden 5-aza-citidina, por ejemplo, sintetizados químicamente o enzimáticamente *in vitro*.

40 Los análogos de oligonucleótidos de la presente invención abarcan cualquier sal, éster, o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal incluido un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación también se refiere a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes.

45 El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o las células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otros agentes químicos y/o condiciones. En particular, las versiones profármaco de los análogos de oligonucleótido de la invención se pueden preparar formando uno o más enlaces éster con cualquiera de los grupos hidroxilo en el anillo de azúcar utilizando un compuesto orgánico que contiene un grupo carboxilo, o como derivados SATE [(S-acetil-2-tiofenil)fosfato] de acuerdo con los métodos divulgados en el documento WO 93/24510 de Gosselin et al., publicado el 9 de diciembre, 1993 o en el documento WO 94/26764 y patente de EE.UU. n.º 5.770.713 de Imbach et al.

50 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no confieren efectos toxicológicos no deseados a los mismos.

60 Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Los ejemplos de metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares. Los ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletildiamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, dicitohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaína (véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19). Las sales de adición de base de dichos compuestos

ácidos se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de manera convencional. La forma de ácido libre puede regenerarse poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre de manera convencional. Las formas de ácido libre difieren de sus formas de sal respectivas hasta cierto punto en determinadas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás, las sales son equivalentes a su ácido libre respectivo para los fines de la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, una "sal de adición farmacéutica" incluye una sal farmacéuticamente aceptable de una forma de ácido de uno de los componentes de las composiciones de la invención. Estas incluyen sales de ácidos orgánicos e inorgánicos de aminas. Las sales ácidas preferidas son los clorhidratos, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas se conocen bien por los expertos en la materia e incluyen sales básicas de una diversidad de ácidos orgánicos e inorgánicos, tal como, por ejemplo, con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos orgánicos carboxílicos, sulfónicos, sulfo o fosfo o ácidos sulfámicos N-sustituídos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; y con aminoácidos, tales como los 20 alfa-aminoácidos implicados en la síntesis de proteínas en la naturaleza, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico, y también con ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido 4-metilbenzenosulfónico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, 2- o 3-fosfoglicerato, glucosa-6-fosfato, ácido N-ciclohexanosulfámico (con la formación de ciclamatos), o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido ascórbico. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos también pueden prepararse con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente aceptables adecuados se conocen bien por los expertos en la materia e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio y de amonio cuaternario. Los carbonatos o hidrogenocarbonatos también son posibles.

Para los análogos de oligonucleótidos de la presente invención, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación (a) sales formadas con cationes, tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas, tales como espermita y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales, tales como cloro, bromo, y yodo.

La invención también abarca compuestos aislados. Un compuesto aislado se refiere a un compuesto que representa al menos un 10 %, preferentemente un 20 %, más preferentemente un 50 % y lo más preferentemente un 80 % del compuesto presente en la mezcla, y muestra una actividad inhibidora detectable (es decir, estadísticamente significativa) de metilación de ADN cuando se ensaya en ensayos biológicos, tales como el análisis de restricción de bisulfito combinado o COBRA (Xiong, Z.; Laird, P. W. Nucleic Acids Res. 1997, 25, 2532-2534) y el ensayo de incorporación de metilo radiomarcado (Francis, K. T.; Thompson, R. W.; Krumdieck, C. L. Am. J. Clin. Nutr. 1977, 30, 2028-2032).

2. Formulaciones farmacéuticas de la presente invención

De acuerdo con la presente invención, los análogos de nucleótidos o compuestos de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticamente aceptables para tratar varias enfermedades y afecciones.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención comprenden uno o más compuestos de la invención en asociación con uno o más vehículos y/o diluyentes y/o adyuvantes y/o excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, citados colectivamente en el presente documento como materiales de "vehículo", y si se desea, otros principios activos.

Los compuestos de la presente invención se administran mediante cualquier ruta, preferentemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha ruta, tal como se ilustra a continuación y dependen de la afección que se esté tratando. Los compuestos y composiciones pueden, por ejemplo, administrarse por vía oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposomal, mediante inhalación, por vía vaginal, intraocular, mediante administración local (por ejemplo, mediante un catéter o endoprótesis), por vía subcutánea, intraadiposa, intraarticular o intratecal.

La formulación farmacéutica puede incluir además opcionalmente un excipiente añadido en una cantidad suficiente para potenciar la estabilidad de la composición, mantener el producto en solución o prevenir efectos secundarios (por ejemplo, ulceración potencial, irritación o extravasación vascular) asociados con la administración de la

5 formulación de la invención. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero sin limitación, manitol, sorbitol lactosa, dextrosa, ciclodextrina, tal como, α -, β -, y γ -ciclodextrina, y ciclodextrina amorfa modificada, tal como α -, β -, y γ -ciclodextrina sustituida con hidroxipropilo, hidroxietilo, glucosilo, maltosilo, matotriosilo, carboxiamidometilo, carboximetilo, sulfobutiléter y dietilamino. Las ciclodextrinas, tales como Encapsin® de Janssen Pharmaceuticals o sus equivalentes pueden usarse para este fin.

10 Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de, por ejemplo, comprimido, cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se elabora preferentemente en forma de dosis unitaria que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo. Los ejemplos de dichas dosis unitarias son comprimidos y cápsulas. Con fines terapéuticos, los comprimidos y cápsulas que pueden contener, además del principio activo, vehículos convencionales, tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, goma arábica, gelatina, polivinilpirrolidona, sorbitol o tragacanto; cargas, por ejemplo, fosfato de calcio, glicina, lactosa, almidón de maíz, sorbitol o sacarosa; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, polietilenglicol, sílice, o talco; disgregantes, por ejemplo, almidón de patata, agentes aromatizantes o colorantes, o agentes humectantes adecuados. Las preparaciones líquidas orales están generalmente en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos que pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes suspensores, agentes emulsionantes, agentes no acuosos, conservantes, agentes colorantes y agentes aromatizantes. Los ejemplos de aditivos para preparaciones líquidas incluyen goma arábica, aceite de almendras, alcohol etílico, aceite de coco fraccionado, gelatina, jarabe de glucosa, glicerina, grasas comestibles hidrogenadas, lecitina, metilcelulosa, para-
20 hidroxibenzoato de metilo o propilo, propilenglicol, sorbitol o ácido sórbico.

25 Para uso tópico, los compuestos de la presente invención también pueden prepararse en formas adecuadas para su aplicación a la piel, o membranas mucosas de la nariz y la garganta, y pueden estar en forma de cremas, pomadas, pulverizadores o inhalantes líquidos, pastillas para chupar o tinturas para la garganta. Dichas formulaciones tópicas pueden incluir además compuestos químicos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO) para facilitar la penetración superficial del principio activo.

30 Para aplicación a los ojos o al oído, los compuestos de la presente invención pueden presentarse en forma líquida o semilíquida formulados en bases hidrófobas o hidrófilas en forma de pomadas, cremas, lociones, tinturas o polvos.

35 Para administración rectal, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma de supositorios mezclados con vehículos convencionales, tales como manteca de cacao, cera u otro glicérido.

40 Como alternativa, los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de polvo para su reconstitución en el vehículo farmacéuticamente aceptable en el momento de su administración.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inyección. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para inyección estériles isotónicas acuosas o no acuosas. Estas soluciones o suspensiones pueden prepararse a partir de polvos o gránulos estériles que tengan uno o más de los vehículos mencionados para su uso en las formulaciones para administración oral. Los compuestos pueden disolverse en polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, alcohol bencílico, cloruro de sodio, y/o diversos tampones.

50 Los análogos de oligonucleótidos de la presente invención pueden prepararse y formularse en forma de emulsiones. Las emulsiones son sistemas típicamente heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotas que normalmente son mayores de 0,1 μm de diámetro. (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 245; Bloque en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 2, pág. 335; Higuchi et al., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 301). Las emulsiones normalmente son sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas íntimamente y dispersas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad bien de agua en aceite (a/ac) o de aceite en agua (ac/a). Cuando una fase acuosa se divide finamente en y de dispersa como gotitas minúsculas en una fase de aceite en bruto, la composición resultante se denomina una emulsión de agua en aceite (a/ac). Como alternativa, cuando una fase oleosa se divide finamente en y se dispersa como gotitas minúsculas en una fase acuosa en bruto, la composición resultante se denomina una emulsión de aceite en agua (ac/a). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y el fármaco activo, que puede estar presente en forma de una solución en bien la fase acuosa, la fase oleosa o en sí en forma de una fase separada. Los excipientes farmacéuticos, tales como emulsionantes, estabilizantes, tintes, y antioxidantes también pueden estar presentes en emulsiones, según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que están compuestas de más de dos fases, tales como, por ejemplo, en el caso de emulsiones de aceite en agua y en aceite (ac/a/ac) y de agua en aceite y en agua (a/ac/a). Dichas formulaciones complejas a menudo proporcionan determinadas ventajas que las demás emulsiones binarias no proporcionan. Múltiples emulsiones en las que las gotitas de aceite individuales de una emulsión de ac/a encierran pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión a/ac/a. Igualmente un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en un continuo de aceite proporciona una emulsión de ac/a/ac.

Las emulsiones se caracterizan por muy poca o ninguna estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersa en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma por medio de emulsionantes o por la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de bases de pomada y cremas de tipo emulsión. Otros medios para estabilizar emulsiones implica el uso de emulsionantes que pueden incorporarse en cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes pueden clasificarse ampliamente en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes de origen natural, bases de absorción, y sólidos finamente divididos (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 199).

Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes activos de superficie, se han podido emplear ampliamente en la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, Volumen 1, pág. 199). Los tensioactivos son típicamente anfífilos y comprenden una porción hidrófila y una hidrófoba. La proporción de la naturaleza hidrófila a la hidrófoba del tensioactivo se ha denominado el equilibrio hidrófilo/lipófilo (EHL) y es una herramienta valiosa para clasificar y seleccionar tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos pueden clasificarse en diferentes clases basándose en la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónico, aniónico, catiónico y anfotérico (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 285).

Los emulsionantes de origen natural usados en formulaciones en emulsión incluyen lanolina, cera de abeja, fosfátidos, lecitina y goma arábiga. Las bases de absorción poseen propiedades hidrófilas, de tal forma que pueden absorber agua para formar emulsiones a/a/c y seguir manteniendo sus consistencias semisólidas, tales como lanolina anhidra y vaselina hidrófila. También se han usado sólidos finamente divididos como buenos emulsionantes, especialmente en combinación con tensioactivos y preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas que no se hinchan, tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de magnesio y aluminio coloidal, pigmentos y sólidos no polares, tales como carbono y triestearato de glicerilo.

También se incluyen una gran variedad de materiales no emulsionantes en formulaciones en emulsión y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 199).

Los coloides hidrófilos o hidrocóloides incluyen gomas de origen natural y polímeros sintéticos, tales como polisacáridos (por ejemplo, goma arábiga, agar, ácido alginico, carragenano, goma guar, goma de karaya, y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, ésteres de celulosa, y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o hinchan en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan emulsiones formando películas interfaciales fuertes alrededor de las gotitas de la fase dispersa y aumentando la viscosidad de la fase externa.

Ya que las emulsiones a menudo contienen una serie de ingredientes, tales como carbohidratos, proteínas, esteroides y fosfatidas que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones a menudo incorporan conservantes. Los conservantes de uso común incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metil parabeno, propil parabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, y ácido bórico. También se añaden comúnmente antioxidantes a las formulaciones en emulsión para prevenir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser secuestrantes de radicales libres, tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, o agentes reductores, tales como ácido ascórbico y metabisulfito sódico, y sinergistas antioxidantes, tales como ácido cítrico, ácido tartárico, y lecitina.

La aplicación de formulaciones en emulsión mediante las rutas dermatológica, oral y parenteral y los métodos para su fabricación se han revisado en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 199). Las formulaciones en emulsión para administración se han usado muy ampliamente debido a razones de facilidad de formulación y eficacia desde un punto de vista de la absorción y la biodisponibilidad. (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 199). Los laxantes con base de aceite mineral, vitaminas solubles en aceite y preparaciones nutritivas altas en grasa se encuentran entre los materiales que se han administrado comúnmente por vía oral como emulsiones de a/c/a.

En una realización de la presente invención, los análogos de oligonucleótidos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión puede definirse como un sistema de agua, aceite y un anfífilo que es una solución líquida

ópticamente, isotrópicamente y termodinámicamente estable individual (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando en primer lugar un agente en una solución de tensioactivo acuoso y después añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de cadena de longitud intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, también se han descrito las microemulsiones como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente claras de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, co-tensioactivo y electrolito. El hecho de que la microemulsión sea de tipo de agua en aceite (a/ac) o de aceite en agua (ac/a) depende de las propiedades del aceite y el tensioactivo usado y de la estructura y empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y las colas de hidrocarburos de las moléculas de tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 271).

La estrategia fenomenológica que utiliza diagramas de fase se ha estudiado extensivamente y ha proporcionado un conocimiento exhaustivo, para los expertos en la materia, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 245; Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 335). En comparación con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estable que se forman espontáneamente.

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero sin limitación, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, oleil éteres de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o en combinación con co-tensioactivos. El co-tensioactivo, normalmente un alcohol de cadena corta, tal como etanol, 1-propanol, y 1-butanol sirve para aumentar la fluidez interfacial penetrando en la película de tensioactivo y creando por consiguiente una película desordenada debido al espacio hueco generado entre las moléculas de tensioactivo. Las microemulsiones pueden, sin embargo, prepararse sin el uso de co-tensioactivos y se conocen en la técnica sistemas de microemulsiones autoemulsionantes sin alcohol. La fase acuosa puede ser típicamente, pero sin limitación, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poliglicérols, propilenglicoles, y derivados de etilenglicol. La fase acuosa puede incluir, pero sin limitación, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente interesantes desde el punto de vista de solubilización del fármaco y la absorción potenciada de fármacos. Se ha propuesto que las microemulsiones basadas en lípidos (tanto ac/a como a/ac) potencian la biodisponibilidad oral de fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan las ventajas de mayor solubilización de fármaco, de protección del fármaco frente a la hidrólisis enzimática, de posible potenciación de absorción de fármaco debido a las alteraciones inducidas por tensioactivos en la fluidez y permeabilidad de membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración frente a formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada, y toxicidad disminuida (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). A menudo, las microemulsiones pueden formarse espontáneamente cuando sus componentes se juntan a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos, péptidos u oligonucleótidos termolábiles. Las microemulsiones también han sido eficaces para la administración transdérmica de los componentes activos en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones de microemulsión de la presente invención faciliten la absorción sistémica aumentada de oligonucleótidos y ácidos nucleicos a través del tracto gastrointestinal, así como mejorar la captación celular local de los oligonucleótidos y ácidos nucleicos en el tracto gastrointestinal, la vagina, la cavidad bucal y otras áreas de administración.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales, tales como monoestearato de sorbitán (Grill 3), Labrasol, y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para potenciar la absorción de los oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración usados en las microemulsiones de la presente invención pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92). Cada una de estas clases se ha discutido anteriormente.

Aparte de las microemulsiones hay muchas estructuras de tensioactivo organizadas que se han estudiado y usado para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como

liposomas, han atraído gran interés debido a su especificidad y a la duración de la acción que ofrecen desde el punto de vista de administración de fármaco. Tal como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

5 Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso. La parte acuosa contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de ser capaces de fusionarse a la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no son capaces de fusionarse de manera tan eficaz con la pared celular, son captados por los macrófagos *in vivo*.

10 Para atravesar la piel intacta de los mamíferos, las vesículas de lípido tienen que pasar a través de una serie de finos poros, cada uno con un diámetro menor de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por lo tanto, es deseable usar un liposoma que sea elevadamente deformable y que sea capaz de pasar a través de dichos finos poros.

15 Las ventajas adicionales de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia variedad de fármacos solubles en agua y en lípidos; los liposomas pueden proteger a fármacos encapsulados en sus compartimentos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 245). La carga superficial del lípido, el tamaño de las vesículas y el volumen acuoso de los liposomas son consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas.

20 Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de ingredientes activos para el sitio de acción. Debido a que la membrana liposómica es similar estructuralmente a las membranas biológicas, cuando se aplican liposomas a un tejido, los liposomas empiezan a juntarse a las membranas celulares. A medida que progresa la fusión del liposoma y la célula, los contenidos liposómicos se vacían dentro de la célula donde puede actuar el agente activo.

25 Las formulaciones liposómicas han sido el foco de investigación extensiva como modo de administración para muchos fármacos. Hay cada vez más pruebas de que para administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas frente a otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con una elevada absorción sistémica del fármaco administrado, una acumulación aumentada del fármaco administrado en la diana deseada, y la capacidad para administrar una gran variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, a la piel.

30 Los liposomas se encuentran en dos clases amplias. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. El complejo de ADN cargado positivamente/liposoma se une a la superficie celular cargada negativamente y se internaliza en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen, liberando sus contenidos en el citoplasma celular (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

35 Los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente, atrapan al ADN en vez de formar un complejo con este. Ya que tanto el ADN y el lípido están cargados de manera similar, sucede más la repulsión que la formación de complejos. Sin embargo, algo de ADN se queda atrapado en el interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH se han usado para administrar ADN que codifica el gen de timidina cinasa a monocapas celulares en cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células dianas (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

40 Un tipo importante de composición liposómica incluye fosfolípidos distintos de la fosfatidilcolina de origen natural. Las composiciones liposómicas neutras, por ejemplo, pueden formarse a partir de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos se forman generalmente a partir de dimiristoil fosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposómica se forma a partir de fosfatidilcolina (PC), tales como, por ejemplo, PC de soja, y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípidos y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

45 Los sistemas liposómicos no iónicos también se han examinado para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden un tensioactivo no iónico y colesterol. Las formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/éter de polioxietilen-10-estearilo) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/éter de polioxietilen-10-estearilo) se usaron para administrar ciclosporina A a la dermis de la piel de ratón. Los resultados indicaron que dichos sistemas liposómicos no iónicos fueron eficaces para facilitar la deposición de ciclosporina A en diferentes capas de la piel (Hu et al., *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

65 Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se

incorporan en liposomas, dan como resultado tiempos de circulación potenciados en relación a liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción lipídica formadora de vesículas del liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tales como monosialogangliósido GM_1 , o (B) se deriva con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría en particular, en la técnica se cree que, al menos para liposomas estabilizados estéricamente que contiene gangliósidos, esfingomiélinas o lípidos derivados con PEG, la semivida en circulación potenciada de estos liposomas estabilizados estéricamente a partir de una captación reducida en células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53,3765).

Se conocen en la técnica varios liposomas que comprenden uno o más glucolípidos. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) comunicaron la capacidad del monosialogangliósido GM_1 , del sulfato de galactocerebrósido y del fosfatidilinositol para mejorar las semividas en sangre de los liposomas. Estos descubrimientos se expusieron por Gabizon et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85,6949). La Patente de Estados Unidos N° 4.837.028 y el documento WO 88/04924, ambas de Allen et al., divulgan liposomas que comprenden (1) esfingomiélinas y (2) el gangliósido GM_1 o un éster de sulfato de galactocerebrósido. La Patente de Estados Unidos N° 5.543.152 (Webb et al.) divulga liposomas que comprenden esfingomiélinas. Los liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se divulgan en el documento WO 97/13499 (Lim et al.).

Muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos, y los métodos para la preparación de los mismos, se conocen en la técnica. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53,2778) describieron liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C₁₂ 15G, que contiene un resto de PEG. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) indicaron que el recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado semividas en sangre significativamente potenciadas. Los fosfolípidos sintéticos modificados mediante la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) se describen por Sears (Patentes de Estados Unidos N° 4.426.330 y 4.534.899). Klivanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describieron experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato de PEG tienen aumentos significativos en las semividas en la circulación sanguínea. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extendieron dichas observaciones a otros fosfolípidos derivatizados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado a partir de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen restos de PEG unidos covalentemente a su superficie externa se describen en la Patente Europea N° EP 0 445 131 B1 y en el documento WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1-20 por ciento de moles de PE derivatizada con PEG, y los métodos de uso de las mismas, se describen por Woodle et al. (Patentes de Estados Unidos N° 5.013.556 y 5.356.633) y Martin et al. (Patente de Estados Unidos N° 5.213.804 y la Patente Europea N° EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden una serie de conjugados de polímero de lípido se divulgan en el documento WO 91/05545 y en la Patente de Estados Unidos N° 5.225.212 (ambas de Martin et al.) y en el documento WO 94/20073 (Zalipsky et al.) Los liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG se describen en el documento WO 96/10391 (Choi et al.). Las Patentes de Estados Unidos N° 5.540.935 (Miyazaki et al.) y 5.556.948 (Tagawa et al.) describen liposomas que contienen PEG que pueden derivatizarse además con restos funcionales en sus superficies.

Se conocen en la técnica un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos. El documento WO 96/40062 de Thierry et al. divulga métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La Patente de Estados Unidos N° 5.264.221 de Tagawa et al. divulga liposomas unidos a proteínas y afirma que los contenidos de dichos liposomas pueden incluir un ARN antisentido. La Patente de Estados Unidos N° 5.665.710 de Rahman et al. describe determinados métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. El documento WO 97/04787 de Love et al. divulga liposomas que comprenden oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen raf.

Los transferosomas son otro tipo más de liposomas, y son agregados lipídicos elevadamente deformables que son atractivos para vehículos de administración de fármacos. Los transferosomas pueden describirse como gotitas lipídicas que son tan elevadamente deformables que son fácilmente capaces para penetrar a través de los poros que son más pequeños que la gota. Los transferosomas son adaptables al ambiente en el que se usan, por ejemplo, se optimizan a sí mismos (se adaptan a la forma de los poros en la piel), se reparan a sí mismos, alcanzan frecuentemente a sus dianas sin fragmentación, y a menudo se cargan a sí mismos. Para producir transferosomas es posible añadir activadores del borde superficial, normalmente tensioactivos, a una composición liposomal convencional. Los transferosomas se han usado para administrar seroalbúmina a la piel. La administración mediada por transferosoma de seroalbúmina ha demostrado ser tan eficaz como una inyección subcutánea de una solución que contiene seroalbúmina.

Los tensioactivos encuentran una amplia aplicación en formulaciones, tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La forma más común de clasificar y puntuar las propiedades de los muchos diferentes tipos de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrófilo (también conocida como la "cabeza") proporciona el medio más útil para categorizar los diferentes tensioactivos usados en formulaciones (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, pág. 285).

Si la molécula de tensioactivo no está ionizada, se clasifica como un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos tienen gran aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y son usables frente a un gran abanico de valores de pH. En general, sus valores de HLB varían desde 2 hasta aproximadamente 18 en su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos, tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa, y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas no iónicas y los éteres, tales como etoxilatos de alcoholes grasos, alcoholes propoxilados y polímeros de bloque etoxilados/propoxilados también se incluyen en esta clase. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo porta una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos, tales como jabones, lactilatos de acilo, amidas de acilo de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico, tales como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos, tales como sulfonatos de alquilbenceno, isetonatos de acilo, tauratos de acilo y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los sulfatos de alquilo y los jabones.

Si la molécula de tensioactivo porta una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como catiónico. Los tensioactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternario son los miembros más usados de esta clase.

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad para portar una carga bien positiva o negativa, el tensioactivo se clasifica como anfotérico. Los tensioactivos anfotéricos incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfatidas.

El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y emulsiones se ha revisado (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, pág. 285).

En una realización particular, los compuestos de la presente invención pueden formularse en una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el compuesto solvatado en un disolvente no acuoso que incluye glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, o combinaciones de los mismos. Se cree que los compuestos serán estables en dichas formulaciones farmacéuticas de tal forma que las formulaciones farmacéuticas puedan almacenarse durante un periodo de tiempo prolongado antes de su uso.

En el tratamiento clínico actual con decitabina, para minimizar la descomposición del fármaco, la decitabina se suministra como un polvo liofilizado y se reconstituye en una solución acuosa fría que contiene agua en al menos un 40 % en vol. del disolvente, tal como APA, y se diluye en fluidos fríos para infusión antes de su administración. Dicha formulación y régimen de tratamiento tiene ciertos inconvenientes. En primer lugar, la refrigeración de la decitabina en solución fría se hace esencial, lo que es costoso en cuanto a su manipulación y es económicamente menos deseable que una formulación que pueda soportar almacenamiento a temperaturas mayores. En segundo lugar, debido a la rápida descomposición de la decitabina en solución acuosa, la solución de decitabina reconstituida solo puede infundirse a un paciente durante un máximo de 3 h si la solución se ha almacenado en el refrigerador durante menos de 7 h. Además, la infusión de fluido frío puede provocar un gran malestar y dolor al paciente, lo que induce la resistencia del paciente a dicho régimen.

Al modificar el anillo de triazina y/o el anillo de ribosa de la decitabina y al formular el compuesto con un disolvente no acuoso, las formulaciones farmacéuticas pueden evitar los problemas anteriormente enumerados asociados con el tratamiento clínico actual con decitabina. Se cree que estas formulaciones de los compuestos de la invención son más estables químicamente que la decitabina formulada en soluciones acuosas que contienen agua en al menos un 40 % en volumen del disolvente.

En una realización preferida, la formulación de la invención contiene menos de un 40 % de agua en el disolvente, opcionalmente menos de un 20 % de agua en el disolvente, opcionalmente menos de un 10 % de agua en el disolvente, u opcionalmente menos de un 1 % de agua en el disolvente. En una variación, la formulación farmacéutica se almacena en una forma sustancialmente anhidra. Opcionalmente, puede añadirse un agente secante a la formulación farmacéutica para absorber agua.

Debido a la estabilidad potenciada, la formulación de la invención puede almacenarse y transportarse a temperatura ambiente, reduciendo de este modo de manera significativa el coste de manipulación del fármaco. Además, la formulación de la invención puede almacenarse convenientemente durante un tiempo prolongado antes de administrarse al paciente. Además, la formulación de la invención puede diluirse con fluido de infusión regular (sin enfriar) y administrarse a un paciente a temperatura ambiente, evitando de este modo el causar al paciente el malestar asociado con la infusión de fluido frío.

En otra realización, el compuesto de la invención se disuelve en glicerina a diferentes concentraciones. Por ejemplo, la formulación puede comprender opcionalmente entre 0,1 y 200, entre 1 y 100; entre 1 y 50; entre 2 y 50; entre 2 y

100; entre 5 y 100; entre 10 y 100 o entre 20 y 100 mg del compuesto de la invención por ml de glicerina. Los ejemplos específicos del compuesto de la invención por concentraciones de glicerina incluyen, pero sin limitación a 2, 5, 10, 20, 22, 25, 30, 40 y 50 mg/ml.

5 Pueden usarse diferentes grados de glicerina (sinónimos: 1,2,3-propanotriol; glicerol; alcohol glicólico; glicerol anhidro) para preparar las formulaciones. Preferentemente, se usa glicerina con una pureza química mayor del 90 % para preparar las formulaciones.

10 En otra realización, el compuesto de la invención se disuelve en propilenglicol a diferentes concentraciones. Por ejemplo, la formulación puede comprender opcionalmente entre 0,1 y 200, entre 0,1 y 100; entre 0,1 y 50; entre 2 y 50; entre 2 y 100; entre 5 y 100; entre 10 y 100 o entre 20 y 100 mg del compuesto de la invención por ml de propilenglicol. Los ejemplos específicos de decitabina por concentraciones de propilenglicol incluyen, pero sin limitación a 2, 5, 10, 20, 22, 25, 30,40 y 50 mg/ml.

15 En otra realización más, el compuesto de la invención se disuelve en un disolvente que combina glicerina y propilenglicol a diferentes concentraciones. La concentración de propilenglicol en el disolvente es de entre un 0,1-99,9 %, opcionalmente entre un 1-90 %, entre un 10-80 %, o entre un 50-70 %.

20 En otra realización más, el compuesto de la invención se disuelve a diferentes concentraciones en un disolvente que combina glicerina y polietilenglicol (PEG) tal como PEG300, PEG400 y PEG1000. La concentración de polietilenglicol en el disolvente es de entre un 0,1-99,9 %, opcionalmente entre un 1-90 %, entre un 10-80 %, o entre un 50-70 %.

25 En otra realización más, el compuesto de la invención se disuelve a diferentes concentraciones en un disolvente que combina propilenglicol, polietilenglicol y glicerina. La concentración de propilenglicol en el disolvente es de entre un 0,1-99,9 %, opcionalmente entre un 1-90 %, entre un 10-60 %, o entre un 20-40 %; y la concentración del polietilenglicol en el disolvente es de entre un 0,1-99,9 %, opcionalmente entre un 1-90 %, entre un 10-80 %, o entre un 50-70 %.

30 Se cree y se ha demostrado experimentalmente que la adición de propilenglicol puede mejorar adicionalmente la estabilidad química, reducir la viscosidad de las formulaciones y facilitar la disolución del compuesto de la invención en el disolvente.

35 La formulación farmacéutica puede comprender además un agente acidificante añadido a la formulación en una proporción, de tal forma que la formulación tiene un pH resultante entre 4 y 8. El agente acidificante puede ser un ácido orgánico. Los ejemplos de ácido orgánico incluyen, pero sin limitación, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido fórmico, ácido benenosulfónico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido glutámico, ácido succínico, ácido aspártico, ácido diatrizoico, y ácido acético. El agente acidificante también puede ser un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido nítrico.

40 Se cree que la adición de un agente acidificante a la formulación para mantener un pH relativamente neutro (por ejemplo, a pH 4-8) facilita la disolución fácil del compuesto de la invención en el disolvente y potencia la estabilidad a largo plazo de la formulación. En solución alcalina, hay una descomposición rápida reversible de la decitabina a N-(formilamidino)-N'- β -D-2-desoxirribofuranosilurea, que se descompone irreversiblemente para formar 1- β -D-2'-desoxirribofuranosil-3-guanilurea. La primera etapa de la degradación hidrolítica implica la formación de formato de N-amidinio-N'-(2-desoxi- β -D-eritropentofuranosil)urea (AUF). La segunda fase de la degradación a una temperatura elevada implica la formación de guanidina. En solución ácida, se forma N-(formilamidino)-N'- β -D-2-desoxirribofuranosilurea y algunos compuestos no identificados. En una solución fuertemente ácida (a pH <2,2) se produce 5-azacitosina. Por lo tanto, mantener un pH relativamente neutro puede ser ventajoso para la formulación que comprende los análogos y derivados de decitabina.

50 En una variación, el agente acidificante es ácido ascórbico a una concentración de 0,01-0,2 mg/ml del disolvente, opcionalmente 0,04-0,1 mg/ml o 0,03-0,07 mg/ml del disolvente.

55 El pH de la formulación farmacéutica puede ajustarse a entre pH 4 y pH 8, preferentemente entre pH 5 y pH 7, y más preferentemente entre pH 5,5 y pH 6,8.

60 La formulación farmacéutica es preferentemente al menos un 80 %, 90 %, 95 % o más estable tras almacenamiento a 25 °C durante 7, 14, 21, 28 o más días. La formulación farmacéutica también es preferentemente al menos un 80 %, 90 %, 95 % o más estable tras almacenamiento a 40 °C durante 7, 14, 21, 28 o más días.

65 En una realización, la formulación farmacéutica de la presente invención se prepara tomando glicerina y disolviendo el compuesto de la invención en la glicerina. Esto puede efectuarse, por ejemplo, añadiendo el compuesto de la invención a la glicerina o añadiendo la glicerina a la decitabina. Mediante el mezclado, se forma la formulación farmacéutica.

Opcionalmente, el método comprende además etapas adicionales para aumentar la velocidad a la que el compuesto de la invención se solvata por la glicerina. Los ejemplos de etapas adicionales que pueden efectuarse incluyen, pero sin limitación, agitación, calentamiento, extensión del periodo de solvatación, y aplicación del compuesto de la invención micronizado y las combinaciones de los mismos.

En una variación, se aplica agitación. Los ejemplos de agitación incluyen, pero sin limitación, agitación mecánica, sonicación, mezclado convencional, agitación convencional y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la agitación mecánica de las formulaciones puede efectuarse de acuerdo con los protocolos del fabricante mediante un homogeneizador Silverson fabricado por Silverson Machines Inc., (East Longmeadow, MA).

En otra variación, puede aplicarse calor. Opcionalmente, las formulaciones pueden calentarse en un baño de agua. Preferentemente, la temperatura de las formulaciones calentadas puede ser menos de 70 °C, más preferentemente, entre 25 °C y 40 °C. A modo de ejemplo, la formulación puede calentarse a 37 °C.

En otra variación más, el compuesto de la invención se solvata en glicerina durante un periodo de tiempo prolongado.

En otra variación más, también puede emplearse una forma micronizada del compuesto de la invención para potenciar la cinética de solvatación. Opcionalmente, la micronización puede efectuarse mediante un proceso de trituración. Como ejemplo, la micronización puede efectuarse mediante procesos de trituración efectuados en un Mastersizer usando una trituradora de Air Jet, fabricada por IncFluid Energy Aljet Inc. (Boise, IDTelford, PA).

Opcionalmente, el método comprende además ajustar el pH de las formulaciones farmacéuticas mediante métodos usados de manera común. En una variación, el pH se ajusta mediante la adición de ácido, tal como ácido ascórbico, o de base, tal como hidróxido de sodio. En otra variación, el pH se ajusta y estabiliza mediante la adición de soluciones tamponadas, tal como una solución de sal disódica de ácido (etilendinitrilo)tetraacético (EDTA). Ya que se sabe que la decitabina es sensible al pH, ajustar el pH de las formulaciones farmacéuticas a aproximadamente pH 7 puede aumentar la estabilidad del componente terapéutico.

Opcionalmente, el método comprende además la separación del compuesto de la invención no disuelto a partir de las formulaciones farmacéuticas. La separación puede efectuarse mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, un método de separación adecuado puede incluir uno o más de filtración, sedimentación y centrifugación de las formulaciones farmacéuticas. La coagulación que puede estar causada por partículas no disueltas del compuesto de la invención puede convertirse en un obstáculo para la administración de las formulaciones farmacéuticas y un peligro potencial para el paciente. La separación de compuesto de la invención no disuelto a partir de las formulaciones farmacéuticas puede facilitar la administración y potenciar la seguridad del producto terapéutico.

Opcionalmente, el método comprende además la esterilización de las formulaciones farmacéuticas. La esterilización puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, un método de esterilización adecuado puede incluir uno o más de esterilización por filtración, química, irradiación, calor y adición de un desinfectante químico a la formulación farmacéutica.

Tal como se observa, la decitabina es inestable en agua y por lo tanto puede ser deseable reducir el contenido de agua de la glicerina usada para formular el compuesto de la invención. Por consiguiente, antes de la etapa de disolución y/o esterilización, hay que secar la glicerina. Dicho secado de la glicerina o de la solución del compuesto de la invención en la glicerina puede lograrse mediante la adición de un agente secante farmacéuticamente aceptable a la glicerina. La glicerina de las formulaciones de la invención puede secarse, por ejemplo, mediante filtración a través de una capa que comprende un agente secante.

Opcionalmente, el método puede comprender además añadir uno o más miembros del grupo seleccionado entre agentes secantes, agentes tamponadores, antioxidantes, estabilizantes, antimicrobianos, y agentes farmacéuticamente inactivos. En una variación, pueden añadirse antioxidantes, tales como ácido ascórbico, sales de ascorbato y mezclas de los mismos. En otra variación pueden añadirse estabilizantes, tales como glicoles.

3. Vasos o kits que contienen compuestos o formulaciones de la invención

Las formulaciones farmacéuticas, descritas en esta invención, pueden estar contenidas en un vaso esterilizado, tal como jeringas, viales o ampollas de diversos tamaños y capacidades. El vaso esterilizado puede contener opcionalmente entre 1-50 ml, 1-25 ml o 1-20 ml o 1-10 ml de las formulaciones. Los vasos esterilizados mantienen la esterilidad de las formulaciones farmacéuticas, facilitan el transporte y almacenamiento, y permiten la administración de las formulaciones farmacéuticas sin una etapa previa de esterilización.

Se incluyen por referencia kits para administrar el compuesto de la invención a un hospedador que lo necesite. En un caso, el kit comprende el compuesto de la invención en un sólido, preferentemente en forma de polvo, y un diluyente no acuoso que comprende glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, o combinaciones de los mismos. La

mezcla de decitabina sólida y el diluyente da como resultado preferentemente la formación de una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el kit puede comprender un primer vaso que comprende el compuesto de la invención en forma sólida; y un vaso contenedor que comprende un diluyente que comprende glicerina; en el que la adición del diluyente al compuesto de la invención sólido da como resultado la formación de una formulación farmacéutica para administrar el compuesto de la invención. La mezcla del sólido del compuesto de la invención y del diluyente puede formar opcionalmente una formulación farmacéutica que comprende entre 0,1 y 200 mg del compuesto de la invención por ml del diluyente, opcionalmente entre 0,1 y 100, entre 2 mg y 50 mg, 5 mg y 30 mg, entre 10 mg y 25 mg por ml del disolvente.

De acuerdo con el kit descrito anteriormente, el diluyente es una combinación de propilenglicol y glicerina, en el que la concentración de propilenglicol en el disolvente es de entre un 0,1-99,9 %, opcionalmente entre un 1-90 %, entre un 10-60 %, o entre un 20-40 %.

También de acuerdo con el kit descrito anteriormente, el diluyente es una combinación de polietilenglicol y glicerina, en el que la concentración de polietilenglicol en el disolvente es de entre un 0,1-99,9 %, opcionalmente entre un 1-90 %, entre un 10-60 %, o entre un 20-40 %.

También de acuerdo con el kit descrito anteriormente, el diluyente es una combinación de propilenglicol, polietilenglicol y glicerina, en el que la concentración de propilenglicol en el disolvente es de entre un 0,1-99,9 %, opcionalmente entre un 1-90 %, entre un 10-60 %, o entre un 20-40 %; y la concentración del polietilenglicol en el disolvente es de entre un 0,1-99,9 %, opcionalmente entre un 1-90 %, entre un 10-60 %, o entre un 20-40 %.

El diluyente también comprende opcionalmente un 40 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2 % o menos de agua. En una variación, el diluyente es anhidro y puede comprender además opcionalmente un agente secante. El diluyente también puede comprender opcionalmente uno o más agentes secantes, glicoles, antioxidantes y/o antimicrobianos.

El kit puede incluir además opcionalmente instrucciones. Las instrucciones pueden describir cómo el sólido del compuesto de la invención y el diluyente deben mezclarse para formar una formulación farmacéutica. Las instrucciones también pueden describir cómo administrar la formulación farmacéutica resultante a un paciente. Se indica que las instrucciones pueden describir opcionalmente los métodos de administración de acuerdo con la presente invención.

El diluyente y el compuesto de la invención pueden estar contenidos en vasos separados. Los vasos pueden presentarse en diferentes tamaños. Por ejemplo, el vaso puede comprender entre 1 y 50, 1 y 25, 1 y 20, o 1 y 10 ml del diluyente.

Las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en los vasos o kits pueden estar en una forma tal que sea adecuada para administración directa o puede estar en una forma concentrada que necesite dilución en relación a lo que se administra al paciente. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas, descritas en esta invención, pueden estar en una forma que sea adecuada para administración directa mediante infusión.

Los métodos y kits descritos en el presente documento proporcionan flexibilidad en la que la estabilidad y el efecto terapéutico de las formulaciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención pueden además potenciarse o complementarse.

4. Métodos para administrar los compuestos/composiciones de la invención

Los compuestos/formulaciones de la presente invención pueden administrarse por cualquier ruta, preferentemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha ruta, tal como se ilustra a continuación y dependen de la afección que se esté tratando. Los compuestos o formulaciones pueden, por ejemplo, administrarse por vía oral, por vía parenteral, por vía tópica, por vía intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, por vía intramuscular, por vía rectal, transbucal, intranasal, liposomal, mediante inhalación, por vía vaginal, intraocular, mediante administración local (por ejemplo, mediante un catéter o endoprótesis), subcutánea, intraadiposa, intraarticular o intratecal. Los compuestos y/o composiciones de acuerdo con la invención también pueden administrarse o coadministrarse en formas de dosificación de liberación lenta.

Los compuestos y/o composiciones de esta invención pueden administrarse o coadministrarse en cualquier forma de dosificación convencional. La coadministración, en el contexto de esta invención se define como la administración de más de un agente terapéutico en el trascurso de un tratamiento coordinado para lograr un resultado clínico mejorado. Dicha administración también puede ser coexistente, es decir, suceder durante periodos de tiempo solapantes.

El compuesto de la invención o la composición que contiene el compuesto de la invención puede administrarse a un hospedador, tal como un paciente a una dosis de 0,1-1000 mg/m², opcionalmente 1-200 mg/m², opcionalmente 1-50 mg/m², opcionalmente 1-40 mg/m², opcionalmente 1-30 mg/m², opcionalmente 1-20 mg/m², u opcionalmente 5-30 mg/m².

5 Por ejemplo, el compuesto/composición de la presente invención puede suministrarse como un polvo estéril para inyección, junto con una sal tamponadora, tal como dihidrogenopotasio y un modificador del pH, tal como hidróxido de sodio. Esta formulación se almacena preferentemente a 2 8 °C, que debería mantener el fármaco estable durante al menos 2 años. Esta formulación en polvo puede reconstituirse con 10 ml de agua estéril para inyección. Esta solución puede diluirse adicionalmente con fluido para infusión conocido en la técnica, tal como inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, inyección de dextrosa al 5 % e inyección lactada de Ringer. Se prefiere que las soluciones reconstituidas y diluidas se usen tras 4-6 horas para una administración de potencia máxima.

10 En una realización preferida, el compuesto/composición de la invención se administra a un paciente mediante inyección, tal como inyección subcutánea, inyección i.v. de bolo, infusión i.v. continua e infusión i.v. durante 1 hora. Opcionalmente, el compuesto/composición de la invención se administra a un paciente mediante una infusión i.v. de 1-24 horas por día durante 3-5 días por ciclo de tratamiento a una dosis de 0,1-1000 mg/m² por día, opcionalmente a una dosis de 1-100 mg/m² por día, opcionalmente a una dosis de 2-50 mg/m² por día, opcionalmente a una dosis de 10-30 mg/m² por día, u opcionalmente a una dosis de 5-20 mg/m² por día.

20 Para la decitabina o azacitidina, la dosificación por debajo de 50 mg/m² se considera mucho más baja que aquella usada en la quimioterapia convencional para el cáncer. Mediante el uso de dicha baja dosis del análogo/derivado de decitabina o azacitidina, la actividad transcripcional de los genes silenciados en las células cancerosas mediante metilación aberrante puede activarse para desencadenar la transducción de señales aguas abajo, dando lugar a la detención del crecimiento celular, de la diferenciación y a la apoptosis, que finalmente da como resultado la muerte de estas células cancerosas. Esta baja dosis, sin embargo, debe tener un efecto citotóxico sistémico menor en las células normales, y por lo tanto tener menores efectos secundarios en el paciente que se esté tratando.

25 Las formulaciones farmacéuticas pueden coadministrarse de cualquier forma convencional con uno o más miembros seleccionados del grupo que comprende fluidos de infusión, compuestos terapéuticos, fluidos nutricionales, fluidos antimicrobianos, agentes tamponadores y estabilizantes.

30 Tal como se ha descrito anteriormente, los compuestos de la invención pueden formularse en una forma líquida solvatando el compuesto de la invención en un disolvente no acuoso, tal como glicerina. Las formulaciones líquidas farmacéuticas proporcionan la ventaja adicional de ser administrables directamente (por ejemplo, sin dilución adicional) y por lo tanto pueden almacenarse en una forma estable hasta su administración. Además, debido a que la glicerina puede mezclarse fácilmente con agua, las formulaciones pueden diluirse fácil y rápidamente justo antes de su administración. Por ejemplo, Las formulaciones farmacéuticas pueden diluirse con agua 180, 60, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1 minuto o menos antes de su administración a un paciente.

40 Los pacientes pueden recibir las formulaciones farmacéuticas por vía intravenosa. La ruta de administración preferida es mediante infusión intravenosa. Opcionalmente, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden infundirse directamente, sin reconstitución previa.

45 En una realización, la formulación farmacéutica se infundiona a través de un conector, tal como un conector de sitio Y, que tiene tres brazos, cada uno conectado a un tubo. Como ejemplo, puede usarse conectores Y Baxter® de diversos tamaños. Se une un vaso que contiene las formulaciones farmacéuticas a un tubo unido adicionalmente a un brazo del conector. Los fluidos de infusión, tales como cloruro de sodio al 0,9 %, o dextrosa al 5 %, o glucosa al 5 %, o solución de Ringer lactada, se infunden a través de un tubo unido al otro brazo del conector de sitio Y. Los fluidos de infusión y las formulaciones farmacéuticas se mezclan dentro del conector de sitio Y. La mezcla resultante se infundiona al paciente a través de un tubo conectado al tercer brazo del conector de sitio Y. La ventaja de esta estrategia de administración frente a la técnica anterior es que el compuesto de la invención se mezcla con fluidos de infusión antes de que entre en el cuerpo del paciente, reduciendo de este modo el tiempo durante el que el compuesto de la invención pueda descomponerse debido al contacto con agua. Por ejemplo, el compuesto de la invención se mezcla menos de 10, 5, 2 o 1 minuto antes de entrar al cuerpo del paciente.

50 Puede infundirse a los pacientes con las formulaciones farmacéuticas durante 1, 2, 3, 4, 5 o más horas, como resultado de la estabilidad potenciada de las formulaciones. Los periodos prolongados de infusión permiten pautas flexibles de administración de formulaciones terapéuticas.

60 Como alternativa o además, la velocidad y volumen de la infusión puede regularse de acuerdo con las necesidades del paciente. La regulación de la infusión de las formulaciones farmacéuticas puede efectuarse de acuerdo con protocolos existentes.

65 Las formulaciones farmacéuticas pueden infundirse conjuntamente en cualquier forma convencional con uno o más miembros seleccionados entre el grupo que comprende fluidos de infusión, compuestos terapéuticos, fluidos nutricionales, fluidos antimicrobianos, agentes tamponadores y estabilizantes. Opcionalmente, puede infundirse componentes terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, agentes antineoplásicos, agentes alquilantes, agentes que son miembros de la superfamilia de los retinoides, agentes antibióticos, agentes hormonales, agentes derivados de

plantas, agentes biológicos, interleucinas, interferones, citocinas, agentes inmunomoduladores y anticuerpos monoclonales con las formulaciones de la invención.

La infusión conjunta en el contexto de la presente invención se define como la infusión de más de un agente terapéutico en un ciclo de tratamiento coordinado para lograr un resultado clínico mejorado. Dicha infusión conjunta puede ser simultánea, solapante o secuencial. En un ejemplo particular, la infusión conjunta de las formulaciones farmacéuticas y los fluidos de infusión puede efectuarse a través de un conector de tipo Y.

La farmacocinética y el metabolismo de las formulaciones farmacéuticas administradas por vía intravenosa se asemejan a la farmacocinética y al metabolismo del compuesto de la invención administrado por vía intravenosa.

En seres humanos, la decitabina mostró una fase de distribución con una semivida de 7 minutos y una semivida terminal en el orden de 10-35 minutos medida mediante un bioensayo. El volumen de distribución es de aproximadamente 4,6 l/kg. La corta semivida en plasma se debe a la inactivación rápida de la decitabina mediante desaminación por la citidina desaminasa hepática. La eliminación en seres humanos es elevada, del orden de 126 ml/min/kg. El área media bajo la curva de plasma en un total de 5 pacientes fue de 408 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{l}$ con un pico de concentración en plasma de 2,01 μM . En pacientes, las concentraciones de decitabina fueron de aproximadamente 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2 μM) cuando se administran a 100 mg/m² en forma de una infusión de 3 horas. Durante un tiempo de infusión más largo (de hasta 40 horas) la concentración en plasma fue de aproximadamente 0,1 a 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Con tiempos de infusión de 40-60 horas, a una velocidad de infusión de 1 mg/kg/h, se lograron concentraciones en plasma de 0,43-0,76 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La concentración en plasma de estado estacionaron a una velocidad de infusión de 1 mg/kg/h se estima en 0,2-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La semivida después de discontinuar la infusión es de 12-20 min. La concentración en plasma en estado estacionario de la decitabina se estimó en 0,31-0,39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante una infusión de 6 horas de 100 mg/m². El intervalo de concentraciones durante una infusión de 600 mg/m² fue de 0,41-16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La penetración de la decitabina en el fluido cerebroespinal en el ser humano alcanza el 14-21 % de la concentración en plasma al final de una infusión intravenosa de 36 horas. La excreción urinaria de decitabina no cambiada es baja, variando desde menos del 0,01 % hasta el 0,9 % de la dosis total, y no hay relación entre la excreción y la dosis o niveles de fármaco en plasma. Los elevados valores de eliminación y una excreción urinaria total menor del 1 % de la dosis total administrada sugieren que la decitabina se elimina rápidamente y en gran medida mediante procesos metabólicos.

Debido a su estabilidad potenciada en comparación con la decitabina, los compuestos/composiciones de la invención pueden disfrutar de una vida útil más larga cuando se almacenan y evitar los problemas asociados con el uso clínico de la decitabina. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden suministrarse en forma de polvo liofilizado, opcionalmente con un excipiente (por ejemplo, ciclodextrina), ácido (por ejemplo, ácido ascórbico), álcali (hidróxido de sodio), o sal de tampón (dihidrógeno fosfato de potasio monobásico). El polvo liofilizado puede reconstituirse con agua estéril para inyección, por ejemplo, i.v., i.p., i.m., o por vía subcutánea. Opcionalmente, el polvo puede reconstituirse con disolvente acuoso o no acuoso que comprende un disolvente miscible en agua, tal como glicerina, propilenglicol, etanol y PEG. La solución resultante puede administrarse directamente al paciente, o diluirse adicionalmente con fluido de infusión, tal como cloruro de sodio al 0,9 %; dextrosa al 5 %; glucosa al 5 %; y fluido de infusión de Ringer lactado.

Los compuestos/composiciones de la invención pueden almacenarse en condiciones ambientales o en un ambiente controlado, tal como con refrigeración (2-8 °C; 36-46 °F). Debido a su superior estabilidad en comparación con la decitabina, los compuestos/composiciones de la invención pueden almacenarse a temperatura ambiente, reconstituirse con fluido de inyección y administrarse al paciente sin enfriamiento previo de la solución de fármaco.

Además, debido a su estabilidad química potenciada, el compuesto/composición de la invención debe tener una semivida en plasma mayor en comparación con la de la decitabina. Por lo tanto, el compuesto/composición de la invención puede administrarse al paciente a una dosis menor y/o menos frecuentemente que para decitabina.

5. Terapia combinada con composiciones farmacéuticas de la invención

Los compuestos o formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en conjunción con inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) para modular adicionalmente la transcripción de genes, por ejemplo, para restablecer la transcripción de genes silenciados mediante la hipermetilación y acetilación de histonas, de una manera sinérgica.

HDAC desempeña papeles importantes en el silenciamiento de la transcripción de genes. La cantidad de acetilación en las histonas se controla mediante las actividades opuestas de dos tipos de enzimas, acetil transferasa de histonas (HAT) y desacetilasas de histonas (HDAC). Los sustratos para estas enzimas incluyen grupos e-amino de restos de lisina situados en las colas amino-terminal de las histonas H3, H4, H2A, y H2B. Estos restos de aminoácidos se acetilan por HAT y se desacetilan por HDAC. Con la retirada de los grupos acetilo de la lisina de la histona por HDAC, se restaura una carga positiva al resto de lisina, condensando de este modo la estructura del nucleosoma y silenciando los genes contenidos en este. Por lo tanto, para activar estos genes silenciados por la desacetilasa de histonas, debería inhibirse la actividad de los HDAC. Con la inhibición de los HDAC, las histonas se

acetilan y el ADN que está fuertemente enrollado alrededor, se relaja un núcleo de histona desacetilada. La apertura de la conformación del ADN da lugar a la expresión de genes específicos.

Además de la desacetilación de histonas, los HDAC también pueden regular la expresión génica desacetilando factores de transcripción, tales como p53 (un gen supresor de tumores), GATA-1, TFIIE, y TFIIF. Gu y Roeder (1997) Cell 90:595-606 (p53); y Boyes et al. (1998) Nature 396:594-598 (GATA-1). Los HDAC también participan en la regulación del ciclo celular, por ejemplo, mediante la represión de la transcripción que está mediada por las proteínas supresoras tumorales RB que reclutan los HDAC. Brehm et al. (1998) Nature 391:597-601. Por lo tanto, la inhibición de los HDAC debería activar la expresión de genes supresores tumorales, tales como p53 y RB y por consiguiente promover la detención del crecimiento celular, de la diferenciación y la apoptosis inducida por estos genes.

Tal como se ha descrito anteriormente, el silenciamiento transcripcional aberrante de una serie de genes, tales como genes supresores de tumores, está directamente relacionado con la patogénesis del cáncer y otras enfermedades. La metilación de restos de citosina en el ADN y la retirada de grupos acetilo de histonas son los dos mecanismos principales para el silenciamiento génico. Debido a la metilación y/o histona desacetilada de genes relacionados con el cáncer, se suprime o se silencia completamente la expresión de estos genes. Mientras tanto, la expresión de estos genes es necesaria para la inducción de la detención del crecimiento, la diferenciación, y/o la muerte celular apoptótica de células transformadas. La inacción de estos genes en las células transformadas da lugar a una proliferación descontrolada de estas células, que con el tiempo dan como resultado un cáncer.

Al combinar los compuestos/composiciones de la invención con inhibidores de HDAC, los genes necesarios para la inducción de la detención del crecimiento, diferenciación y muerte celular de células transformadas puede reactivarse de manera eficaz. Los compuestos/composiciones de la invención inhiben la metilación del ADN para los genes, especialmente en la región reguladora, por consiguiente dando como resultado la activación de la transcripción del gen. Mientras tanto, los inhibidores de HDAC inhiben a la desacetilasa de las histonas en el núcleo nucleosómico del gen, dando por lo tanto como resultado un aumento neto de la acetilación de histonas, que, a su vez, activa la transcripción del gen. Al explotar estos dos mecanismos complementarios, la terapia combinada puede restablecer la transcripción génica de manera más eficaz y, de manera ideal, de una manera sinérgica. Una terapia combinada que tenga efectos sinérgicos debe requerir una cantidad menor de cada inhibidor que cuando se usan solos, reduciendo de este modo los efectos secundarios potenciales asociados con la administración sistémica de altas dosis de los inhibidores y mejorando el índice terapéutico.

Muchos agentes anticáncer ejercen sus efectos anticancerígenos desencadenando cascadas de transducción de señales que implican proteínas codificadas por estos genes supresores de tumores. Con expresión insuficiente de estos genes en células cancerosas, los efectos anticancerígenos de estos agentes antineoplásicos pueden reducirse gravemente o erradicarse por completo. Mediante la reactivación o re expresión de estos genes que están silenciados epigenéticamente mediante la metilación del ADN y la histona desacetilasa, los mecanismos intrínsecos de defensa del organismo se movilizan para combatir la enfermedad restaurando las funciones supresoras tumorales a las células cancerosas en respuesta a señales enviadas por el agente anticáncer administrado. Dicha estimulación de las funciones supresoras tumorales intrínsecas del cuerpo deben dar lugar a la necesidad de una dosificación menor del agente anticáncer, por lo tanto dando como resultado un mayor índice terapéutico (es decir, una mayor eficacia y menor toxicidad) del agente.

Los inhibidores de HDAC incluyen, pero sin limitación, las siguientes clases estructurales: 1) ácidos hidroxámicos, 2) péptidos cíclicos, 3) benzamida, y 4) ácidos grasos de cadena corta.

Los ejemplos de ácidos hidroxámicos y derivados del ácido hidroxámico incluyen, pero sin limitación, tricostatina A (TSA), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), oxamflatina, ácido subérico bishidroxámico (SBHA), ácido m-carboxi-cinnámico ácido bishidroxámico (CBHA), y piroxamida. TSA se aisló a partir de un antibiótico antifúngico (Tsuji et al (1976) J. Antibiot (Tokyo) 29:1-6) y se descubrió que era un potente inhibidor del HDAC de mamífero (Yoshida et al. (1990) J. BioL Chem. 265:17174-17179). El descubrimiento de que las líneas celulares resistentes a TSA tienen un HDAC alterado evidencian que esta enzima es una diana importante para TSA. Otros inhibidores de HDAC basados en ácido hidroxámico, SAHA, SBHA, y CBHA son compuesto sintéticos que son capaces de inhibir a HDAC a una concentración micromolar o menor *in vitro* o *in vivo*. Glick et al. (1999) Cancer Res. 59:4392-4399. Todos estos inhibidores de HDAC basados en ácido hidroxámico poseen una característica estructural esencial: un hidroxámico polar terminal unido mediante un espaciador de metileno hidrófobo (por ejemplo, 6 carbonos de longitud) a otro sitio polar que se une a un resto hidrófobo terminal (por ejemplo, anillo de benceno). Los compuestos desarrollados que tengan dichas características esenciales también se encuentran dentro del alcance de los ácidos hidroxámicos que pueden usarse como inhibidores de HDAC.

Los péptidos cíclicos usados como inhibidores de HDAC son principalmente tetrapéptidos cíclicos. Los ejemplos de péptidos cíclicos incluyen, pero sin limitación, trapoxina A, apicidina y FR901228. La trapoxina A es un tetrapéptido cíclico que contiene un resto de 2-amino-8-oxo-9,10-epoxi-decanoilo (AOE). Kijima et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:22429-22435. La apicidina es un metabolito fúngico que muestra una actividad potente de amplio espectro anti-protozoos e inhibe la actividad de HDAC a concentraciones nanomolares. Darkin-Rattray et al. (1996) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA. 93; 13143-13147. FR901228 es un depsipéptido que se aísla a partir de *Chromobacterium violaceum*, y se ha demostrado que inhibe la actividad de HDAC a concentraciones micromolares.

Los ejemplos de benzamidas incluyen, pero sin limitación, MS-27-275. Saito et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:4592-4597. Los ejemplos de ácidos grasos de cadena corta incluyen, pero sin limitación, butiratos (por ejemplo, ácido butírico, butirato de arginina y fenilbutirato (PB)). Newmark et al. (1994) Cancer Lett. 78:1-5; y Carducci et al. (1997) Anticancer Res. 17:3972-3973. Además, la depudecina, que ha demostrado inhibir a HDAC a concentraciones micromolares (Kwon et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3356-3361) también se encuentra dentro del ámbito del inhibidor de histona desacetilasa de la presente invención.

Los compuestos o formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden usarse conjuntamente con otros componentes terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, agente antineoplásicos, agentes alquilantes, agentes que son miembros de la superfamilia de los retinoides, agentes antibióticos, agentes hormonales, agentes derivados de plantas, agentes biológicos, interleucinas, interferones, citocinas, agentes inmunomoduladores y anticuerpos monoclonales.

En una realización, se usa un agente alquilante en combinación con y/o añadido a el compuesto/formulación de la invención. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero sin limitación, biscloroetilaminas (mostazas de nitrógeno, por ejemplo, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melfalán, mostaza de uracilo), aziridinas (por ejemplo, tiotepa), sulfonatos de alquilalcona (por ejemplo, busulfán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina, estreptozocina), agentes alquilantes no clásicos (altretamina, dacarbazina, y procarbazona), compuestos de platino (carboplatino y cisplatino).

En otra realización, cisplatino, se usa carboplatino o ciclofosfamida en combinación con y/o añadido al compuesto/formulación de la invención.

En otra realización, se usa un miembro de la superfamilia de los retinoides en combinación con y/o añadido al compuesto/formulación de la invención. Los retinoides son una familia de moléculas relacionadas estructuralmente y funcionalmente que se derivan o están relacionadas con la vitamina A (retinol todo trans). Los ejemplos de retinoides incluyen, pero sin limitación, retinol todo trans, ácido todo trans retinoico (tretinoína), ácido 13-cis retinoico (isotretinoína) y ácido 9-cis-retinoico.

En otra realización más, se usa un agente hormonal en combinación con y/o añadido al compuesto/formulación de la invención. Los ejemplos de dicho agente hormonal son estrógenos sintéticos (por ejemplo, dietilestilbestrol), antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, fluoximesterol y raloxifeno), antiandrógenos (bicalutamida, nilutamida, flutamida), inhibidores de aromataza (por ejemplo, aminoglutetimida, anastrozol y tetrazol), ketoconazol, acetato de goserelina, leuprolida, acetato de megestrol y mifepristona.

En otra realización más, se usa un agente derivado de plantas en combinación con y/o añadido al compuesto/formulación de la invención. Los ejemplos de agentes derivados de plantas incluyen, pero sin limitación, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinzolidina y vinorelbina), camptotecina (20(S)-camptotecina, 9-nitro-20(S)-camptotecina, y 9-amino-20(S)-camptotecina), podofilotoxinas (por ejemplo, etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26)), y taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel).

En otra realización más, se usa un agente biológico en combinación con y/o añadido al compuesto/formulación de la invención, tal como proteínas inmunomoduladoras, tales como citocinas, anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales, genes supresores tumorales, y vacunas contra el cáncer.

Los ejemplos de interleucinas que pueden usarse en combinación con y/o añadido al compuesto/formulación de la invención incluyen, pero sin limitación, interleucina 2 (IL-2), e interleucina 4 (IL-4), interleucina 12 (IL-12). Los ejemplos de interferones que pueden usarse en conjunción con las formulaciones de decitabina-glicerina incluyen, pero sin limitación, interferón α , interferón β (interferón de fibroblastos) e interferón γ (interferón de fibroblastos). Los ejemplos de dichas citocinas incluyen, pero sin limitación, eritropoyetina (epoyetina), CSF de granulocitos (filgrastim), y CSF de granulocitos y macrófagos (sargramostim). Los agentes inmunomoduladores distintos de citocinas incluyen, pero sin limitación bacilo de Calmette-Guerin, levamisol, y octreotida,

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales que pueden usarse en conjunción con las formulaciones de la invención incluyen, pero sin limitación, HERCEPTIN® (Trastuzumab), RITUXAN® (Rituximab), MYLOTARG® (anti-CD33), and CAMPATH® (anti-CD52).

6. Indicaciones para compuestos o composiciones farmacéuticas de la presente invención

Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para tratar una amplia variedad de enfermedades que son sensibles al tratamiento con decitabina.

Las indicaciones preferentes que pueden tratarse usando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen aquellas que implican una proliferación celular no deseable o descontrolada. Dichas indicaciones incluyen tumores benignos, proliferación celular anormal debida a lesiones a tejidos corporales debidas a cirugía, angiogénesis anormal o una enfermedad asociada con la angiogénesis anormal, enfermedades que producen fibrosis de tejidos, trastornos repetitivos del movimiento, trastornos de tejidos que no están altamente vascularizados, y respuestas proliferativas asociadas con trasplantes de órganos.

En general, las células en un tumor benigno mantienen sus características diferenciadas y no se dividen de una manera completamente descontrolada. Un tumor benigno está normalmente localizado y no es metastásico. Los tipos específicos de tumores benignos que pueden tratarse usando la presente invención incluyen hemangiomas, adenoma hepatocelular, hemangioma cavernoso, hiperplasia nodular focal, neuromas acústicos, neurofibroma, adenoma del conducto biliar, cistanoma del conducto biliar, fibroma, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, hiperplasia regenerativa nodular, tracomias y granulomas piogénicos.

El tratamiento de la proliferación celular anormal debido a lesiones a tejidos corporales durante la cirugía puede ser posible para una variedad de procedimientos quirúrgicos, incluyendo cirugía articular, cirugía intestinal, y cicatrización de queloides. Las enfermedades que producen tejido fibrótico incluyen enfisema. Los trastornos del movimiento repetitivo que pueden tratarse usando la presente invención incluyen el síndrome del túnel carpiano.

Las respuestas proliferativas asociadas con el trasplante de órganos que pueden tratarse usando la presente invención incluyen aquellas respuestas proliferativas que contribuyen a potenciales rechazos de órganos o complicaciones asociadas. Específicamente, estas respuestas proliferativas pueden suceder durante el trasplante de corazón, de pulmón, de hígado, de riñón, y de otros órganos del cuerpo o sistemas de órganos.

La angiogénesis anormal que puede tratarse usando la presente invención incluyen aquellas angiogénesis anormales que acompañan a la artritis reumatoide, al edema y lesión cerebral relacionada con la reperfusión isquémica, isquemia cortical, hiperplasia e hipervascularidad ovárica, (síndrome del ovario poliquístico), endometriosis, psoriasis, retinopatía diabética, y otras enfermedades oculares angiogénicas, tales como retinopatía del prematuro (retrolental fibroplástico), degeneración muscular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neuroocular y síndrome de Oster Webber.

Las enfermedades asociadas con la angiogénesis anormal requieren o inducen el crecimiento vascular. Por ejemplo, la angiogénesis corneal implica tres fases: un periodo latente pre-vascular, neovascularización activa, y maduración y regresión vascular. La identidad y mecanismo de diversos factores angiogénicos, incluyendo elementos de la respuesta inflamatoria, tales como leucocitos, plaquetas, citocinas, y eicosanoides, o constituyentes del plasma no identificados están aún por revelar.

En otra realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades asociadas con la angiogénesis no deseada o anormal. El método comprende administrara a un paciente que padece de angiogénesis no deseada o anormal las formulaciones farmacéuticas de la presente invención solas, o en combinación con un agente anti-neoplásico cuya actividad con agente anti-neoplásico *in vivo* se vea afectada adversamente por niveles elevados de metilación de ADN. La dosificación particular de estos agentes necesarios para inhibir la angiogénesis y/o enfermedades angiogénicas puede depender de la gravedad de la afección, la vía de administración, y factores relacionados que puedan decidirse por el médico tratante. En general, las dosis diarias aceptadas y eficaces son la cantidad suficiente para inhibir de manera eficaz la angiogénesis y/o enfermedades angiogénicas.

De acuerdo con esta realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser utilizadas para tratar de una diversidad de enfermedades asociadas con la angiogénesis no deseada, tales como neovascularización retinal/coroidal y la neovascularización corneal. Los ejemplos de neovascularización retinal/coroidal incluyen, pero sin limitación, la enfermedad de Bests, miopía, foveas papilares, enfermedad de Stargarts, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, de la anemia de células falciformes, sarcoidosis, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedades obstructivas carotideas, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus sistémico eritematoso, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eale, retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedad de Bechet, infecciones que causan una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones tras cirugía láser, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso, incluyendo todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa. Los ejemplos de neovascularización corneal incluyen, pero sin limitación, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigión, queratitis seca, Sjögren, rosácea del acné, filectenulosis, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto corneal, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, poliarteritis, sarcoidosis de Wegener, escleritis, queratotomía radial penfigoide, glaucoma neovascular y fibroplastia retrolental, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por Herpes simple, infecciones por Herpes zoster, infecciones por protozoos y sarcoma de Kaposi.

En otra realización más, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas asociadas con angiogénesis anormal. El método comprende administrar a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria crónica asociada con la angiogénesis anormal las formulaciones farmacéuticas de la presente invención solas, o en combinación con un agente anti-neoplásico cuya actividad con agente anti-neoplásico *in vivo* se vea afectada adversamente por niveles elevados de metilación de ADN. La inflamación crónica depende de la formación continua de brotes capilares para mantener un flujo de entrada de células inflamatorias. El flujo de entrada y la presencia de las células inflamatorias producen granulomas, y por lo tanto, mantiene el estado inflamatorio crónico. La inhibición de la angiogénesis usando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención puede prevenir la formación de los granulomas, de este modo aliviando la enfermedad. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas incluyen, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis, y artritis reumatoide.

Las enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa están caracterizadas por la inflamación crónica y la angiogénesis en varios sitios del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, La enfermedad de Crohn sucede como una enfermedad inflamatoria transmural que afecta más comúnmente al íleo distal y al colon pero también puede suceder en cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano y la zona perianal. Los pacientes con enfermedad de Crohn tienen generalmente diarrea crónica asociada a dolor abdominal, fiebre, anorexia, pérdida de peso e inflamación abdominal. La colitis ulcerosa también es una enfermedad crónica, no específica, inflamatoria y ulcerosa que surge en la mucosa colónica y está caracterizada por la presencia de diarrea sanguinolenta. Estas enfermedades inflamatorias del intestino están causadas generalmente por una inflamación granulomatosa a lo largo del tracto gastrointestinal, que implica nuevos brotes capilares rodeados por un cilindro de células inflamatorias. La inhibición de la angiogénesis mediante las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debe inhibir la formación de los brotes y evitar la formación de granulomas. Las enfermedades inflamatorias del intestino también muestran manifestaciones intestinales extra, tales como lesiones cutáneas. Dichas lesiones están caracterizadas por la inflamación y la angiogénesis, y pueden suceder en muchos sitios distintos del tracto gastrointestinal. La inhibición de la angiogénesis mediante las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debe reducir el flujo de entrada de células inflamatorias y evitar la formación de lesiones.

La sarcoidosis, otra enfermedad inflamatoria crónica, está caracterizada como un trastorno granulomatoso multisistémico. Los granulomas de esta enfermedad pueden formarse en cualquier parte del cuerpo y, por lo tanto, los síntomas dependen del sitio de los granulomas y de si la enfermedad está activa. Los granulomas se crean mediante los brotes capilares angiogénicos que proporcionan un suministro constante de células inflamatorias. Mediante el uso de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención para inhibir la angiogénesis, dicha formación de granulomas puede inhibirse. La psoriasis, también una enfermedad inflamatoria crónica y recurrente, está caracterizada por pápulas y placas de diversos tamaños. El tratamiento usando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención debe prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características y proporcionar alivio de los síntomas al paciente.

La artritis reumatoide (AR) también es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la inflamación no específica de las articulaciones periféricas. Se cree que los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies reactivas de oxígeno que dan lugar al crecimiento de pannus y a la destrucción de cartílago. Los factores implicados en la angiogénesis pueden contribuir activamente a, y ayudar a mantener, el estado inflamado crónico de la artritis reumatoide. El tratamiento usando las formulaciones farmacéuticas de la presente invención solas o en conjunción con otros agentes anti-AR puede prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener la inflamación crónica y proporcionar al paciente con AR alivio de los síntomas.

La activación génica facilitada por las formulaciones farmacéuticas de la presente invención puede inducir la diferenciación de células con fines terapéuticos. La diferenciación celular se induce mediante el mecanismo de hipometilación. Los ejemplos de diferenciación morfológica y funcional incluyen, pero sin limitación, diferenciación hacia la formación de células musculares, miotubos, células de linajes eritroide y linfoide.

Aunque se han descrito e ilustrado las realizaciones ejemplares de la presente invención, será evidente para un experto habitual en la materia que pueden efectuarse una serie de cambios, modificaciones o alteraciones a la invención tal como se describe en el presente documento. Todos estos cambios, modificaciones y alteraciones deben observarse por lo tanto como pertenecientes al alcance de la presente invención.

Ejemplos

1. Síntesis de bloques de construcción de fosforamidita y derivados protegidos en 3'-O

La presente invención también proporciona métodos químicos eficaces para la síntesis de los siguientes nuevos bloques de construcción de fosforamidita (Figura 2A).

El grupo funcional 4-amina de 1a puede protegerse mediante transformación en diversos grupos protectores (R₁), tales como carbamatos con metilo, etilo, 9-fluorenilmetilo, 9-(2-sulfo)fluorenilmetilo, 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetilo, 17-tetrabenzo[*a,c,g,l*]fluorenilmetilo, 2-cloro-3-indenilmetilo, benz[*f*]inden-3-ilmetilo, 2, 7-di-*terc*-[9-(10,10-dioxo-10,10,10-tetrahidrotioxantil)metilo, 1, 1-dioxobenzo[*b*]tiofen-2-ilmetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-feniletilo, 1-(1-adamantil)-1-metiletilo, 2-cloroetilo, 1,1,-dimetil-2-haloetilo, 1,1-dimetil-2,2-dibromometilo, 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo, 1-metil-1-(4-bifenil)etilo, 1-(3,5-di-*terc*-butilfenil)-1-metiletilo, 2-(2'-y 4'-piridil)etilo, 2,2-bis(4'-nitrofenil)etilo, N-(2-pivaloilamino)-1,1-dimeteiletilo, 2-[(2-nitrofenil)ditio]-1-feniletilo, 2-(*N,N*-dodiclohexilcarboxamido)etilo, *t*-butilo, 1-adamantilo, 2-adamantilo, vinilo, alilo, 1-isopropilalilo, cinnailo, 4-nitrocinnamilo, 3-(3'-piridil)prop-2-enilo, 8-quinolilo, N-hidroxipiperidinilo, alquilditio, bencilo, *p*-metoxibencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-bromobencilo, *p*-clorobencilo, 2,4-diclorobencilo, 4-metilsulfamilbencilo, 9-antrilmetilo, difenilmetilo, 2-metiltioetilo, 2-metilsulfonietilo, 2-(*p*-toluenosulfonil)etilo, [2-(1,3-ditianil)]metilo, 4-metiltiofenilo, 2,4-dimetiltiofenilo, 2-fosfonioetilo, 1-metil-1-(trifenilfosfonio)etilo, 1,1-dimetil-2-cianoetilo, 2-dansiletilo, 4-fenilacetoxibencilo, 4-azidobencilo, 4-azidometoxibencilo, *m*-cloro-paclioxibencilo, *p*-(dihidroxiboril)bencilo, 5-benzisoxazolilmetilo, 2-(trifluoroetil)-6-cromonilmetilo, *m*-nitrofenilo, 3,5-dimetoxibencilo, 1,-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etilo, α -metilnitropiperonilo, *o*-nitrofenilo, 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilo, fenil(*o*-nitrofenil)etilo, 2-(2-nitrofenil)etilo, 6-nitroveratrilo, 4-metoxifenacilo, 3',5'-dimetoxibenzoina, *t*-amilo, *S*-benciltio, butinilo, *p*-cianobencilo, ciclohexilo, ciclopentilo, ciclopropilmetilo, *p*-deciloxibencilo, diisopropilmetilo, 2,2-dimetoxicarbonilvinilo, *o*-(*N,N*dimetilcarboxamido)bencilo, 1,1-dimetil-3-(*N,N*-dimetilcarboxamido)propilo, 1, 1-dimetilpropinilo, 2-furanilmetilo, 2-yodoetilo, isobomilo, isobutilo, isonicotinilo, *p*-(*p*'-metoxifenilazo)bencilo, 1-metilciclobutilo, 1-metilciclohexilo, 1-metil-1-ciclopropilmetilo, 1-metil-1-(*p*-fenilazofenil)etilo, 1-metil-1-feniletilo, 1-metil-1-(4'-piridil)etilo, fenilo, *p*-(fenilazo)bencilo, 2,4,6-tri-*t*-butilfenilo, 4-(trimetilamonio)bencilo, 2,4,6-trimetilbencilo; ureas con fenotiazinil-(10)-carbonilo, *N'*-*p*-toluenosulfonilaminocarbonilo, *N'*-fenilaminotiocarbonilo; amidas, tales como formamida, acetamida, fenoxiacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropamida, pent-4-enamida, *o*-nitrofenilacetamida, *o*-nitrofenoxiacetamida, 3-(*o*-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(*o*-nitrofenoxi)propanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, *o*-nitrocinamida, 3-(4-*t*-butil-2,6-dinitrofenil)-2,2-dimetilpropanamida, *o*-(benzoiloximetil)benzamida, 2-[(*t*-butildifenilsiloxi)metil]metil]benzamida, 3-(3',6'-dioxo-2',4',5'-trimetilciclohexa-1',4'-dien)-3,3-dimetilpropionamida, *o*-hidroxi-*trans*-cinamida, acetoacetamida, *p*-toluenosulfonamida, y bencenosulfonamida. Los análogos de 4-*O*-metoxi (1b) y 4-*S*-metiltio (1c) de decitabina pueden obtenerse modificando el procedimiento publicado para la síntesis de decitabina separando los anómeros α y β de 1-(2-desoxi-3,5-di-*O*-*p*-clorobenzoilo o benzoil-D-ribofuranosil)-4-metoxi o metiltio-1,3,5-triazin-2(*H*)-ona y eliminando los grupos 3,5-protectores sin tratamiento con amoniaco metanólico. Pliml y Sorm (1964) Collect. Czech. Chem. Commun. 29: 2576-2577; Piskala y Sorm (1978) Nucleic Acid Chemistry (por Townsend y Tipson, Wiley, 1978), págs.443-449.

35 La protección del 5'-OH se logra disolviendo la decitabina 4-amino protegida y los análogos 4-metoxi y 4-metiltio (1b, 1c) en piridina anhídra (5 ml/mmol) antes de añadir cloruro de dimetoxitritilo (1,1 equivalentes).

Por ejemplo, se destiló conjuntamente la decitabina (1,2 g) con piridina anhídra y se disolvió en 20 ml de DMF seco. Se añadió hexametildisilazano (2,8 ml). La solución se agitó y dejó reposar durante toda la noche. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo restante se disolvió en tolueno y se evaporó dos veces. La 3',5'-ditrimetilsilil 5-aza-2'-desoxicidina ($F_r = 0,67$, 4:1 diclorometano/metanol) se destiló conjuntamente dos veces con piridina seca (~10 ml) y se disolvió en piridina seca (20 ml). Se añadió anhídrido fenoxiacético (1,5 g), y la solución resultante se agitó durante 1 hora. Se añadieron 0,18 g adicionales de anhídrido fenoxiacético (0,18 g) y se agitó durante otra hora. La mezcla de reacción se evaporó al vacío hasta la sequedad y se destiló conjuntamente con tolueno (3x). En residuo se disolvió en diclorometano (~50 ml) y se extrajo con solución de NaHCO₃ acuoso 1 M (~50 mL), que se volvió a extraer con diclorometano (~20 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se redujeron al vacío para producir 3',5'-di trimetilsilil-N-fenoxiacetil-5-aza-2'-desoxicidina (3 g; $F_r = 0,82$, 9:1 diclorometano/metanol). El material en bruto se disolvió en DMF anhídrido (20 ml) y se transfirió a un tubo falcon de plástico de 50 ml, y se añadió TAS-F (2,4 g) (evolucionado a gas). La reacción procedió durante 4 horas a 22 °C (el vial no se cerró completamente para reducir el aumento de presión). El DMF se evaporó al vacío y el residuo restante se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice 30 g, columna de 2,5 cm, 99:1 a 9:1 diclorometano/metanol). Se obtuvo un sólido de color blanco de N-fenoxiacetil-5-aza-2'-desoxicidina (0,81 g; $F_r = 0,26$, 9:1 diclorometano/metanol). Este compuesto (0,6 g) se destiló conjuntamente dos veces con piridina anhídra y se disolvió en piridina anhídra (20 ml) antes de añadir cloruro de dimetoxitritilo (0,9 g) y se agitó durante 2 horas a 22 °C. Los disolventes se eliminaron al vacío y se destilaron conjuntamente (3x) con tolueno. En residuo se disolvió en diclorometano (50 ml) y se extrajo con solución de NaHCO₃ acuoso 1 M (~50 ml), que se volvió a extraer con diclorometano (~20 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se redujeron al vacío. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice (diclorometano-100 % a 95:5 diclorometano/metanol), que produjo 5'-dimetoxitritil-N-fenoxiacetil-5-aza-2'-desoxicidina (0,35 g, 0,53 mmol, 32 %; $F_r = 0,49$, 9:1 diclorometano/metanol). Este intermedio (0,3 g) se disolvió en acetonitrilo seco (2 ml) antes de que se añadiesen una solución de benciltiotetrazol (0,9 ml) en acetonitrilo seco y fosforodiamidita de cianoetiltetraisopropilo (0,17 ml). La mezcla se agitó a 22 °C durante 1,5 horas. La TLC (2:1 acetato de etilo/hexanos + TEA al 2 %) mostró una mezcla diastereomérica con $F_r = 0,27$ y 0,36. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo restante se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice 20 g, columna de 2,5 cm, 9:1 hexanos/acetato de etilo + TEA al 2 % (300 ml), 1:1 hexanos/acetato de etilo + TEA al 1 % (200 ml), 1:2 hexanos/acetato de etilo + TEA al 0 % (250 ml). La construcción de fosforamidita de decitabina 1d, donde R₁ = fenoxiacetilo (0,297 g, 0,34 mmol, 76 %) eluyó con 1:2

hexanos/acetato de etilo. La IEN-EM de 1d (masa exacta calculada para $C_{46}H_{53}N_6O_9P$ es de 864,36) mostró una m/z 864,1 y 966,4 $[M+NEt_3+H]^+$; ^{31}P RMN ($CDCl_3$, 500 MHz) mostró 149,17 y 149,0 ppm; RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) mostró cambios químicos (ppm) 8,63 y 8,59 (1H, doblete, H-6), 7,4-6,6 (18H, multiplete, DMTr/Pac aromático), 6,05 (1H, triplete, H-1'), 4,79 (2H, singlete, CH_2 de Pac), 4,59 (1H, singlete, H-4'), 4,25 a 4,20 (1H, doblete, H-3'), 3,8-3,7 (1H, multiplete, P-O- CH_2), 3,70 (3H, singlete, CH_3O de DMTr), 3,68 (3H, singlete, CH_3O de DMTr), 3,6-3,48 (3H, multiplete, dos CH de isopropilo y un P-O- CH_2), 3,36-3,27 (2H, multiplete, H-5'), 2,80 (1H, singlete, H-2'), 2,53 (1H, singlete, H-2'), 2,40 (2H, multiplete, CH_2CN), 1,1 (12H, CH_3 de isopropilo).

Además, modificaciones menores de procedimientos publicados permiten el acceso a derivados protegidos en 3'- y 5'-O (Figura 3A, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1l) (Bagnall, Bell y Pearson (1978) J. of Fluorine Chem. 11: 93-107), donde el grupo protector puede ser grupos alquilo, ésteres y ésteres de ácidos grasos, derivados de glicol, tales como etilen y propilenglicoles; y decitabina protegida enlazada en 3' sobre un soporte de vidrio de poro controlado (Figura 3B, 1m, 1n, 1o). Alul, Singman, Zhan y Letsinger (1991) 19: 1527-1532.

Otros derivados de decitabina tienen el 3'-OH protegido con ésteres (que incluyen, pero sin limitación, acetilo, benzoilo, y halobenzoilo; y ácidos grasos) y éteres (que incluyen, pero sin limitación *p*-nitrofeniletilo, metoximetilo, metiltiommetilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo, benciloximetilo, *p*-metoxibenciloximetilo, *p*-nitrobenciloximetilo, *o*-nitrobenciloximetilo, (4-metoxifenoxi)metilo, *t*-butoximetilo, 4-penteniloximetilo, siloximetilo, 2-metoxietoximetilo, 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, mentoximetilo, tetrahidropirano, tetrahidrofuranilo, y 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo), derivados de glicol, tales como etilen y propilenglicoles, tal como se muestra en la Figura 4.

2. Síntesis de dinucleótidos y tetranucleótidos de DpG y GpD sobre un soporte sólido

Los dinucleótidos y tetranucleótidos de DpG y GpD pueden sintetizarse mediante procedimientos convencionales (Figura 5) con una ligera modificación para tiempos de acoplamiento aumentados (> 2 minutos). Beaucage y Caruthers (1981) Tet. Lett. 22: 1859-1862; McBride y Caruthers (1983) Tet. Lett. 24: 245-248. Las síntesis del dinucleótido de GpD 2a y del tetranucleótido de DpGpGpD 3a pueden iniciarse con el acoplamiento de 1m, 1n o 1o con 5'-O-DMTr 2'-desoxiguanosin-3'-O-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita y 5'-O-DMTr 2'-desoxi-5-aza-citidin-3'-O-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamiditas protegidas de base similar (1d, 1e o 1f, tal como se muestra en la Figura 6A. La liberación posterior del soporte sólido (tal como vidrio de poro controlado, CPG) y la retirada de los grupos protectores de carbamato con bases, tales como DBU/piridina (o acetonitrilo), y amoniaco metanólico para la retirada de los grupos protectores 4-O-metoxi y 4-O-metiltio, proporcionan los oligonucleótidos deseados con el último grupo DMTr activo o desactivado. DpGpGpD (3b) puede obtenerse de manera similar (Figura 7).

Por ejemplo (Figura 6A y 6B), un sistema Amersham ÄKTA Oligopilot 10 se carga con un soporte sólido CPG unido decitabina y protegido 1 m (donde R_1 = fenoxiacetilo), que se acopla con 2-2,5 equivalentes de *tert*-butil fenoxiacetil 2'-desoxiguanosin fosforamidita en presencia de activador de benciltriotetrazol 0,3 M al 60 % (en acetonitrilo) durante 2,5 minutos. El soporte sólido de CPG que contenía dinucleótido de GpD protegido se trata con 20 ml de K_2CO_3 50 mM en metanol durante 1 hora y 20 minutos. El producto acoplado se oxida con *tert*-butilhidroperóxido 2 M en acetonitrilo seco (preparado disolviendo *tert*-butilhidroperóxido en *tert*-butilperóxido al 80 %) durante 5 minutos. El grupo protector de dimetoxitritilo se elimina con ácido dicloroacético en tolueno al 3 %. El soporte sólido de CPG se lava con metanol seco; el filtrado se neutraliza mediante la adición de 2 ml de ácido acético 1 M en metanol. La solución se concentra mediante evaporación rotatoria; el residuo se recoge en acetato de trietilamonio 200 mM (pH 6,9), se lava con acetonitrilo (500 μ l de acetonitrilo acuoso al 50 %), y se filtró a través de un filtro de jeringa. El dinucleótido de GpD se purifica posteriormente mediante un dispositivo ÄKTA Explorer 100 HPLC con una columna preparativa Gemini C18 (Phenomenex), 250 x 21,2 mm, 10 μ m con columna de guarda (Phenomenex), 50 x 21,2 mm, 10 μ m, con acetato de trietilamonio 50 mM (pH 7) en agua MilliQ (Fase móvil A) y acetonitrilo en agua MilliQ al 80 % (Fase móvil B), con un 2 % a 20/25 % de la Fase móvil B en volúmenes de columna. La IEN-EM (-ve) del dinucleótido de GpD 2a, donde X^+ = trietilamonio (masa exacta calculada para el compuesto neutro $C_{18}H_{24}N_9O_{10}P$ es 557,14), mostró m/z 556,1 $[M-H]^-$ y 1113,1 para $[2M-H]^-$ (véase el espectro de masas en la Figura 30).

Cuando el ciclo se repite tres veces con 2-2,5 equivalentes de *tert*-butil fenoxiacetil 2'-desoxiguanosina o fenoxiacetil 5-aza-2'-desoxicitidina fosforamidita en presencia de un 60 % de activador de benciltriotetrazol 0,3 M (en acetonitrilo) durante 2,5 minutos y 10 minutos, respectivamente, (Figura 6b y 7), se obtiene el tetranucleótido de DpGpGpD 3b, donde X^+ = trietilamonio (masa exacta calculada para el compuesto neutro $C_{36}H_{47}N_{18}O_{22}P_3$ es 1176,23), mostró m/z 587,2 para $[M-2H]^{2-}$ y 1175,2 $[M-H]^-$ (Figura 32).

Además, el dinucleótido de DpG 2b y GpDpGpD 3c puede sintetizarse acoplando 1s (donde R_1 = grupo protector de carbamato) con bloques de construcción de fosforamidita 1d, 1e o 1f (Figura 8). GpDpDpG y GpDpG (3c') pueden obtenerse de manera similar (Figura 9).

Por ejemplo, cuando un soporte sólido de CPG se une a 2'-desoxiguanosina 1s (donde R_1 = *tert*-butil fenoxiacetilo), que se acopla con 2-2,5 equivalentes de fosforamidita de fenoxiacetil decitabina (Figura 2A, 1d, donde R_1 = fenoxiacetilo; véase el espectro de masas en la Figura 38) en presencia de un 60 % de activador de benciltriotetrazol

0,3 M (en acetonitrilo) durante 10 minutos. El soporte sólido de GPG que contenía dinucleótido de DpG protegido se trata con 20 ml de K_2CO_3 50 mM en metanol durante 1 hora y 20 minutos. El producto acoplado se oxida, se elimina el grupo protector, se lava, se filtra, y se purifica tal como se describe para el dinucleótido de GpD. La IEN-EM (-ve) del dinucleótido de DpG 2b, donde X^+ = trietilamonio (masa exacta calculada para el compuesto neutro $C_{18}H_{24}N_9O_{10}P$ es 557,14), mostró m/z 556,1 [M-H]⁻ y 1113,1 para [2M-H]⁻ (véase el espectro de masas en la Figura 31). El dinucleótido de DpG 2b, donde X^+ = sodio, se obtiene redisolviendo la sal de trietilamonio en 4 ml de agua, 0,2 ml de solución 2M de $NaClO_4$. Cuando se añaden 36 ml de acetona, el dinucleótido se precipita. La solución se mantiene a -20 °C durante varias horas y se centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos. Se desecha el sobrenadante y el sólido se lava con 30 ml de acetona seguido de una centrifugación adicional a 4000 rpm durante 20 minutos. El precipitado se disuelve en agua y se criodeseca, lo que mostró una m/z 556,0 [M-H]⁻ (véase el espectro de masas en la Figura 36).

Cuando el ciclo se repite dos veces con 2-2,5 equivalentes de *terc*-butil fenoxiacetil 2'-desoxiguanosina o fenoxiacetil 5-aza-2'-desoxicitidina fosforamidita en presencia de un 60 % de activador de benciltiotetrazol 0,3 M (en acetonitrilo) durante 2,5 minutos y 10 minutos, respectivamente, se obtiene el trinucleótido de GpDpG 3c', donde X^+ = trietilamonio (masa exacta calculada para el compuesto neutro $C_{28}H_{36}N_{14}O_{16}P_2$ es 886,2), lo que mostró una m/z 885,16 [M-H]⁻ (véase el espectro de masas en la Figura 33).

Cuando se repite el ciclo tres veces, se obtiene el tetranucleótido de DpGpDpG 3c, donde X^+ = trietilamonio (masa exacta calculada para el compuesto neutro $C_{36}H_{47}N_{18}O_{22}P_3$ es 1176,23), que mostró m/z 587,4 para [M-2H]²⁻ y 1175,4 [M-H]⁻ (véase el espectro de masas en la Figura 34).

Cuando el triéster de fosfito, formado de nuevo durante la etapa de acoplamiento, se convierte al correspondiente triéster de fosforotioato con disulfuro de fenilacetilo al 5 % (PADS) en dicloroetano/simcolidina 4/1 (v/v), 4,3 ml de solución (3,6 volúmenes de columna), caudal de 50 cm/h (tiempo de contacto 3 volúmenes de columna), puede obtenerse el derivado de fosforotioato de 2b. La sulfurización se completa a los 3 minutos, tras los cuales el exceso de reactivo se elimina del vaso de reacción lavando con acetonitrilo. La posterior desprotección y purificación, tal como se describe para 2a, proporciona DpG de fosforotioato (Sp y Rp, Figura 13, 2e), donde X^+ = trietilamonio (masa exacta calculada para el compuesto neutro $C_{18}H_{24}N_9O_9PS$ es 573,12), lo que mostró una m/z 571,9 para [M-H]⁻ (véase el espectro de masas en la Figura 35).

Cuando se repite el ciclo una vez con fosforamidita de DMT hexaetilenglicol (60 % de activador, tiempo de acoplamiento 7 min), seguido de oxidación y purificación convencional tal como se describe para 2a, se obtiene el dinucleótido de HEG-DpG 2d (Figura 12), donde X^+ = trietilamonio y Cap = fosfato de hexaetilenglicol (masa exacta calculada para el compuesto neutro $C_{30}H_{49}N_9O_{19}P_2$ es 901,71), lo que mostró una m/z 900,4 [M-H]⁻ (véase el espectro de masas en la Figura 37).

3. Inhibición de la metilación del ADM mediante di-, tri- y tetranucleótidos de DpG y GpD

La actividad desmetilante de los di-, tri- y tetranucleótidos de DpG y GpD se ensayó en un ensayo de GFP (proteína fluorescente verde) basado en células. Este ensayo, que se ilustra esquemáticamente en la Figura 25, tiene un gen de GFP regulado por el promotor de CMV y es sensible a la metilación de sitios de CpG en el promotor. Una disminución en la metilación resultante de la exposición a un inhibidor de la metilación da lugar a la expresión de GFP y se puntúa fácilmente. Específicamente, se usó la línea celular CMV-EE210 que contenía el transgén de GFP silenciado epigenéticamente para ensayar la reactivación de la expresión de GFP mediante citometría de flujo. Se produjo CMV-EE210 transfecando células NIH 3T3 con el plásmido pTR-UF/UF1/UF2 (Zolotuhin et al., 1996), que está compuesto de pBS(+) (Stratagene, Inc.) que contenía un promotor de citomegalovirus (CMV) que dirige un gen de GFP humanizado adaptado para la expresión en células de mamífero. Después de la transfección, las células que expresaban niveles elevados de GFP se seleccionaron inicialmente mediante análisis FACS y clasificación usando un citómetro MoFlo (Cytomation, Inc.). La decitabina, un potente inhibidor de DNMT1 de mamífero, se usó como control positivo. Para explorar respecto de la activación de CMV-EE210, la decitabina (a 1 μ M) o un compuesto de ensayo (a una concentración de 30-50 μ M) se añadió a medio completo (DMEM libre de fenol rojo (Gibco, Life Technologies) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (Hyclone)). Las células se sembraron entonces a un 30 % de confluencia (~ 5000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos que contenían los compuestos de ensayo y se crecieron durante tres días a 37 °C en CO_2 al 5 %. Las placas se examinaron en un microscopio de fluorescencia usando un filtro de excitación de 450-490 (cubo de filtro I3, Leica, Deerfield IL). Los pocillos se puntuaron g1 positivos (10 % de células viables que expresan GFP, g2 positivos si el 30 % de células viables expresan GFP y g3 si > 75 % de las células viables expresan GFP. GFP 50 es la concentración de un inhibidor que (al igual que una CI_{50}) es la dosis en la que el nivel de expresión de GFP va de g3 a g1/2. La Tabla 1 lista los resultados de la prueba para decitabina, DpG, GpD, GpDpG, DpGpGpD y DpGpDpG como inhibidores de la metilación de ADN. Tal como se muestra en la Tabla 1, todos los análogos de 5 oligonucleótido ensayados fueron capaces de inhibir la metilación de ADN de manera eficaz a bajas concentraciones, dando como resultado la reactivación de la transcripción del gen de GFP.

Tabla 1: Exploración preliminar de la activación de desmetilamina

Compuesto	Nivel de expresión de GFP	CI50 (nM)
Decitabina	g3	500
DpG	g3	400
GpD	g3	700
GpDpG	g3	1800
DpGpGpD	g3	1100
DpGpDpG	g3	1400

4. Síntesis de dinucleótidos y tetranucleótidos de DpG y GpD en solución

Para la síntesis de estos oligonucleótidos a gran escala, es deseable el uso de soportes poliméricos solubles. Bayer y Mutter, (1972) *Nature* 237: 512-513; Bonora (1995) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 54: 3-17. El soporte polimérico, poli(etilenglicol) o PEG permite que el proceso sintético se lleve a cabo en una fase homogénea y asegura una etapa de purificación de intermedio sencilla mediante procedimientos sencillos de precipitación y filtración. Química de poli(etilenglicol) de Harris. *Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris (Ed.), Plenum Press, New York (EE.UU.), 1992, págs. 1-14 [cita de libro]. Por ejemplo, los derivados enlazados en 3', tales como 1t, 1u, o 1v (Figura 10) pueden adaptarse fácilmente a la química basada en fosforamidita convencional empleada en los procedimientos de fase sólida precedentes para dar los di- y tetranucleótidos de DpG y GpD 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d.

Como alternativa, el nuevo dinucleótido de DpG 2a puede prepararse en solución acoplado los derivados 1p, 1q, o 1r con 5'-O-DMTr 2'-desoxiguanosina-3'-O-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita y GpD protegidos con base similar mediante el acoplamiento de 2'-desoxiguanosina protegida en 3' de manera similar con 5'-O-DMTr 2'-desoxi-5-azacitidina-3'-O-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamiditas (1d, 1e o 1f) en acetonitrilo y/o diclorometano, seguido de oxidación con yodo/agua, desprotección de los grupos protectores de la base, y la retirada del grupo DMTr (como en el ciclo convencional para la síntesis de oligonucleótidos).

Además, el nuevo dinucleótido de DpG (2c) con el grupo metilo terminal protegido en 3'-OH y 5'-OH puede prepararse acoplado el derivado de 3'-O-metilo 1g, 1h o 1i con un derivado de 5'-O-metilo de 2'-desoxiguanosina-3'-O-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita 1w (Figura 11), seguido de oxidación con yodo/agua, desprotección de los grupos protectores de la base, y la retirada del grupo DMTr (como en el ciclo convencional para la síntesis de oligonucleótidos). El dinucleótido de GpD (2d) puede prepararse igualmente acoplado el derivado de 2'-desoxiguanosina de 3'-O-metilo 1x con derivado de 5'-O-metilo de 2'-5-azacitidin-3'-O-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita 1j, 1k o 1l (Figura 12).

5. Síntesis de oligonucleótidos de DpG y GpD resistentes a citidina desaminasas y nucleasas

En general, los oligonucleótidos en fluidos biológicos se someten a degradación por nucleasas. Stein y Cheng (1993) *Science* 261: 1004-1012; Cohen (1994) *Adv. Pharmacol.* 25: 319-339. Para aumentar la estabilidad y resistencia a la degradación por nucleasas, también se producen dinucleótidos de fosforotioato y derivados de tetranucleótido, tales como 2e, 2f, 3e, 3f, 3g, y 3h (Figura 13, 14 y 15), donde el oxígeno no puenteante internucleótido se reemplaza con azufre. Se usan protocolos de fosforamidita convencionales, excepto para la sustitución de disulfuro de bis(O,O-diisopropoxi fosfinotioil) (S-tetra) para yodo durante la etapa de oxidación. Zon y Stec (1991) en Eckstein, F. (ed.), *Phosphorothioate Analogues' in Oligonucleotides and Their Analogs: A Practical Approach*. IRL Press, págs. 87-108; Zon, G. (1990) en Hancock, W.S. (ed.), *High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology*. Wiley, Nueva York, Ch.14, págs. 310-397 [citas de libro]; Stec, Uznanski, Wilk, Hirschbein, Fearon, y Bergot (1993) *Tet Lett.* 34: 5317-5320; Iyer, Phillips, Egan, Regan, y Beaucage (1990) *J. Org. Chem* 55: 4693-4699.

Otro impedimento potencial a la aplicación de estos oligonucleótidos como agentes farmacéuticos es la presencia ubicua de citidina desaminasa (CDA) ya que la desaminación de la decitabina da como resultado una pérdida total de la actividad. Momparler, Cote y Eliopoulos (1997) *Leukemia* 11 (Supl.1): 1-6; Chabot, Bouchard y Momparler (1983) *Biochem. Pharmacol.* 32: 1327-1328; Laliberte, Marquez y Momparler (1992) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30: 7-11. Para abordar este problema, también se preparan oligonucleótidos que contienen derivados de decitabina con el 4-NH₂ reemplazado por 4-NR₃R₄ (donde R₃ y R₄ pueden ser alquilo, alquilamino, y alcohol de alquilo) para proporcionar derivados tales como 2g, 2h, 2i, 2j, 2k, 2l, 2m, 2n, 3i, 3j, 3k, 3l, 3m, 3n, 3o, y 3p (Figura 16, 17, 18, 19, 20 y 21). Se usan protocolos de fosforamidita convencionales, excepto para la sustitución de aminos de alquilo, dialquilaminas, e hidroxilaminas para amoniacio en metanol durante la retirada del 4-metoxi y 4-metilto. Ya que las aminos secundarias y terciarias, las diaminas, y las hidroxilaminas son peores grupos salientes que el amoniacio, estos derivados son más difíciles de desaminar.

6. Síntesis de oligonucleótidos ricos en DpG y GpD basados en las islas de CpG de las regiones promotoras de genes relacionados con el cáncer, tales como P15 (CDKN2B), BRCA1, y P16 (CDKN2A)

5 Pueden prepararse análogos de oligonucleótidos ricos en islotes de DpG y GpD que varían en longitud de 5 a 100 bases, donde D puede ser decitabina o análogos de decitabina. A diferencia de los dinucleótidos y tetranucleótidos de DpG y GpD anteriormente descritos, estos análogos de oligonucleótidos ricos en DpG y GpD relativamente más largos no solo funcionan de manera restrictiva en las islas de CpG de las regiones promotoras sino específica para un segmento dentro de la secuencia de la región promotora para genes relacionados con el cáncer, tales como P15 (CDKN2B), P16 (CDKN2A) y BRAC1. Por ejemplo, pueden prepararse análogos de oligonucleótidos ricos en DpG y GpD 8-meros, 10-meros y 12-meros (Figura 26) basándose en las secuencias de la región promotora de P15, P16 y BRCA1 (Figura 27, 28 y 29, respectivamente) usando los bloques de construcción de fosforamidita 1d, 1e o 1f en una síntesis de oligonucleótidos en fase sólida convencional. Más ejemplos de oligonucleótidos que pueden modificarse para incorporar 5-aza-citosina en estos se listan en las Figuras 27, 28 y 29. Estos análogos de oligonucleótidos pueden funcionar como cebadores e incorporarse en el ADN en replicación solo en ese segmento específico de la secuencia de la región promotora de P15, P16 o BRAC1, por lo tanto inhibiendo de manera eficaz y selectiva la metilación de la región promotora.

Aunque se han mostrado y descrito en el presente documento realizaciones preferidas de la presente invención, será evidente para los expertos en la materia que dichas realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones serán evidentes para los expertos en la materia sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse varias alternativas a las realizaciones de la invención descrita en el presente documento en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que mediante estas queden cubiertos los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SUPERGEN, INC.

5 <120> ANÁLOGOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS QUE INCORPORAN 5-AZA-CITOSINA EN LOS MISMOS

<130> P032968EP
 <140> 06804123.5
 <141> 2006-09-25
 10 <150> US 11/ 241, 799
 <151> 2005-09-29
 <160> 33

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Análogo de oligonucleótido que se dirige a un segmento de la región promotora de P15

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

<220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

<400> 1
 35 ttngngaa 8

<210> 2
 <211> 8
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo de oligonucleótido que se dirige a un segmento de la región promotora de P15

<220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

<400> 2
 50 tgcctngt 8

<210> 3
 <211> 10
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Análogo de oligonucleótido que se dirige a un segmento de la región promotora de BRCA1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

5 <400> 3
 aggnacagna 10

<210> 4
 <211> 8
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Análogo de oligonucleótido que se dirige a un segmento de la región promotora de BRCA1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 20 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 25 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

<400> 4
 gtgnagna 8

<210> 5
 30 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Análogo de oligonucleótido que se dirige a un segmento de la región promotora de P16

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 40 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 45 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 50 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

<400> 5
 aangggnggn gg 12

<210> 6
 55 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Análogo de oligonucleótido que se dirige a un segmento de la región promotora de P16

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 65 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

ES 2 782 998 T3

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n = decitabina o análogo de decitabina

15 <400> 6
 cangngnggg 10

20 <210> 7
 <211> 2144
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 7

```

tttttcattc agtcaacttg cttcgcgaag ctcacacatc tgccctcgtgc aagattctca      60
gtcatttttac ttagtcattg gttctttccc taccaccatt ctttatgtcc ccctcaaaga      120
aaaacattat cttccatttc cttatcaact ccaaacagot ttcatttttc tgacatattt      180
actacctaag aaaatggctc aagaattggg tagactatct tgtcctaact tttctgataa      240
gtttcagaga aactcaaagg tcaaaacaag agcataagag taaaggtaga gaaattaaga      300
aactgaagac taggaaatgg gggttgggat gggaaagaaa aagaaattgt tataatgcta      360
ccgggttccc ttccctgtcc aggtggattt cagctctgtt gaggctctgt cagtagatat      420
tcagccctaa ccagcacttc catggtggtg gcacttccac tgccctttaa aagaaagagc      480
tttttttaat tctacagga tttgggggat gaggagtcag agctaaggta tcttaaaaaa      540
aacatgtgaa gactotcatt ttgcaataca caagcaattg ccctcctggt aagactttgt      600
cttctcagc actccgaacc aaaatgatc tgtaaacaaa aattgttcac ttttaggaga      660
ggtcactta tgcagttcct caccaaagtt tttaggcaac aaatccataa cttgoggttc      720
tcttctatc caatgtagca tccgctgaaa tgttttaaat attttaagta ataaatggtg      780
attcaaactc acctaggaag attaggaagg ggaaaaaaag cacttggcat ttaaactctc      840
  
```


ES 2 782 998 T3

agaagagaat ttaatgacag gttcagcctg tttaatgaca agcccagcac cacaccctc 900
tcttatgatg tttcattatt actgcataaa tttctttat tactcatgat aaataaaaaat 960
aagatacctg acaaagtggg tttaaatagg taagagtgca aacaaagatt tactgtacaa 1020
atatgatgaa actgggatct cagattctta aagtataatt ttttttgtct tatgtgtgcc 1080
aggttgccac tctcaatctc gaactagttt ttttctcttt taagggttgt atccataatg 1140
caaaaatgga aagaattaa aagcacacgc aaaacatgat tctcgggatt tttctctatt 1200
tttatggttg actaattcaa acagaaagac acatccaaga gaaaattgct aagtttgata 1260
caagttatga aacttgatgaa gcccaagtac tgcctgggga tgaatttaac ttgtatgaca 1320
ggtgcagagc tgtcgtcttc agacatctta agaaagacgg agttattttg aatgactttc 1380
tctcggtcac aagggagcca ccaacgtctc cacagtgaaa ccaactggct ggctgaagga 1440
acagaaatcc tctgctcgc ctactgggga ttaggagctg agggcagtgg tgaacattcc 1500
caaaatatta gccttggtt tactggacat ccagcgagca gtgcagccag cattcctggc 1560
ggctccctgg ccagctctc ggcgatgctg tctagcatc tttgggcagg cttccccgcc 1620
ctcgtgacgc gtcggcccgg gcctggcctc cggcgatca cagcggacag ggggcccagc 1680
ctaagggggt ggggagacgc cggccccttg gccagctga aaacggaatt ctttgccggc 1740
tggctcccca ctctgccaga gcgaggcggg gcagtgagga ctccgcgacg cgtccgcacc 1800
ctgcggccag agcggctttg agctcggctg cgtccgcgct aggcgctttt tcccagaagc 1860
aatccaggcg cgcccgtgg ttcttgagcg ccaggaaaag cccggagcta acgaccggcc 1920
gctcggccac tgcaacggggc cccaagccgc agaaggacga cgggagggta atgaagctga 1980
gccaggtct cctaggaagg agagagtgcg ccggagcagc gtgggaaaga agggaagagt 2040
gtcgttaagt ttacggccaa cggtgatta tccgggccgc tgcgcgtctg ggggctgcgg 2100
aatgcgcgag gagaacaagg gcatgcccag tgggggcccg agcg 2144

5 <210> 8
<211> 8
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 8
ttcgcgaa 8

15 <210> 9
<211> 8
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 9
tgcctcgt 8

<210> 10
<211> 8
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

ES 2 782 998 T3

5 5 8
 tgcoggct
 <210> 11
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 10 5 8
 cggcccgg
 <210> 12
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15 5 8
 <400> 12
 gctcggct
 <210> 13
 20 5 987
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 5
 <400> 13
 cggagagggg gagaacagac aacgggcggc ggggagcagc atggagccgg cggcggggag 60
 cagcatggag ccttcggctg actggtctggc cacggccggg gcccggggtc gggtagagga 120
 ggtgcgggcg ctgctggagg cgggggcgct gcccaacgca ccgaatagtt acggtcggag 180
 gccgatccag gtcgatgaga tgggcagcgc ccgagtggcg gagctgctgc tgcctcaacgg 240
 cggcggagccc aactgcgccg accccggccac tctcaccgga cccgtgcaac acgctgcccc 300
 ggagggcttc ctggacacgc tgggtggtgct gcaccgggccc ggggcgcggc tggacgtgcg 360
 cgatgcctgg ggccgtctgc ccgtggacct ggctgaggag ctgggccatc gcgatgtcgc 420
 acggtacctg cgcgcggctg cggggggcac cagaggcagt aaccatgccc gcatagatgc 480
 cgcggaaggt ccctcagaca tccccgattg aaagaaccag agaggctctg agaaaacctcg 540
 ggaaacttag atcatcagtc accgaaggtc ctacagggcc acaactgccc ccgccacaac 600
 ccaccccgct ttcgtagttt tcatttagaa aatagagctt ttaaaaatgt cctgcctttt 660
 aacgtagata taagccttcc cccactaccg taaatgtcca tttatatcat tttttatata 720
 ttcttataaa aatgtaaaaa agaaaaaacac cgcttctgcc ttttcaactgt gttggagttt 780
 tctggagtga gcactcacgc cctaagcgca cattcatgtg ggcatttctt gcgagcctcg 840
 cagcctccgg aagctgtcga cttcatgaca agcattttgt gaactagga agctcagggg 900
 ggttactggc ttctcttgag tcacactgct agcaaattggc agaaccaaag ctcaaataaa 960
 aataaaataa ttttcattca ttcactc 987
 30 5
 <210> 14
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35 5 12
 <400> 14
 aacgggcggc gg

ES 2 782 998 T3

5 <210> 15
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 15
 cacggcgcg 10

 10 <210> 16
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 15 <400> 16
 cgggcggc 8

 20 <210> 17
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 25 <400> 17
 agcagcat 8

 30 <210> 18
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 35 <400> 18
 gcgccgac 8

 40 <210> 19
 <211> 649
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 19

 ccacctaatt gtactgaatt gcaaattgat agttggttcta gcagtgaaga gataaagaaa 60
 aaaaagtaca accaaatgcc agtcaggcac agcagaaacc tacaactcat ggaaggtaaa 120
 gaacctgcaa ctggagccaa gaagagtaac aagccaaatg aacagacaag taaaagacat 180
 gacagcgata ctttcccaga gctgaagtta acaaatgcac ctggttcttt tactaagtgt 240
 tcaaatacca gtgaacttaa agaatttgtc aatcctagcc ttccaagaga agaaaaagaa 300
 gagaaactag aaacagttag tgtctaataa tgctgaagac cccaaagatc tcatgttaag 360
 tggagaaagg gttttgcaaa ctgaaagatc tgtagagagt agcagtattt cattgggtacc 420
 tgggtactgat tatggcactc aggaaagtat ctogttactg gaagttagca ctctagggaa 480
 ggcaaaaaca gaaccaata aatgtgtgag tcagtgtgca gcatttgaaa accccaaggg 540
 actaattcat ggttgttcca aagataatag aatgacaca gaaggcttta agtatccatt 600
 gggacatgaa gttaaccaca gtcgggaaac aagcatagaa atggaagaa 649

 45 <210> 20
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

	<400> 20 aggcacagca	10	
5	<210> 21 <211> 8 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 21 gtgcagca	8	
15	<210> 22 <211> 8 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
20	<400> 22 cagcgata	8	
25	<210> 23 <211> 8 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
30	<400> 23 tagcagtg	8	
35	<210> 24 <211> 8 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>		
40	<400> 24 aggcttta	8	
45	<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Molde de secuencia para análogo de oligonucleótido como inhibidor de la ADN metiltransferasa		
50	<400> 25 ctggatcct gcccgcccc ttgaattccc	30	
55	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Molde de secuencia para análogo de oligonucleótido como inhibidor de la ADN metiltransferasa		
60	<400> 26 ggaattcaa atgacgtcaa aaggatccag	30	
65	<210> 27 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Molde de secuencia para análogo de oligonucleótido como inhibidor de la ADN metiltransferasa		

ES 2 782 998 T3

<400> 27
 cctaccacc ctggatcct gccccgcccc ttgaattccc aaccctccac 50

5
 <210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Molde de secuencia para análogo de oligonucleótido como inhibidor de la ADN metiltransferasa

15
 <400> 28
 atccttgccc cgccccttga at 22

20
 <210> 29
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Molde de secuencia para análogo de oligonucleótido como inhibidor de la ADN metiltransferasa

30
 <400> 29
 ttgccccgcc cctt 14

35
 <210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Análogo de oligonucleótido como inhibidor de la ADN metiltransferasa

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n = 5-aza-citosina como resto base

50
 <400> 30
 ctggatcct gcccngcccc ttgaattccc 30

55
 <210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Análogo de oligonucleótido con conformación en horquilla

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n = decitabina

70
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = decitabina

75
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> c se sustituye opcionalmente con 5-metil-2'-desoxicitidina

80
 <400> 31
 ctgaanggat ngtttcgatc cgttcag 27

ES 2 782 998 T3

5 <210> 32
<211> 8
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Análogo de oligonucleótido

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n = decitabina

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n = decitabina

20 <400> 32
ttngngaa 8

<210> 33
<211> 8
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Hebra complementaria de la SEC ID: 30

30 <400> 33
ttcgcgaa 8

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, de fórmula general 5'-DpG-3' o 5'-GpD-3', en los que D es decitabina; p es un enlazador fosfo; y G es desoxiguanosina, para su uso en tratamiento de uno o más de los siguientes:
- un tumor benigno seleccionado entre hemangiomas, adenoma hepatocelular, hemangioma cavernoso, hiperplasia nodular focal, neuromas acústicos, neurofibroma, adenoma del conducto biliar, cistanoma del conducto biliar, fibroma, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, hiperplasia regenerativa nodular, tracomas y granulomas piogénicos;
- proliferación celular anormal debida a lesiones a tejidos corporales durante la cirugía, preferentemente cirugía articular, cirugía intestinal, o cicatrización de queloides;
- una enfermedad que produce tejido fibrótico, preferentemente enfisema;
- un trastorno del movimiento repetitivo, preferentemente el síndrome del túnel carpiano;
- una respuesta proliferativa asociada con el trasplante de órganos; y
- angiogénesis anormal, o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o anormal.
2. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, la enfermedad asociada con angiogénesis no deseada o anormal es una enfermedad inflamatoria crónica.
3. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la enfermedad inflamatoria crónica es una enfermedad inflamatoria del intestino.
4. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la enfermedad inflamatoria crónica se selecciona entre enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis, y artritis reumatoide.
5. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la angiogénesis anormal acompaña la artritis reumatoide, el edema y lesión cerebral relacionada con la reperusión isquémica, isquemia cortical, hiperplasia e hipervascularidad ovárica, (síndrome del ovario poliquístico), endometriosis, psoriasis, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro (retrolental fibroplástico), degeneración muscular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neuroocular o síndrome de Oster Webber.
6. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad asociada con angiogénesis no deseada se selecciona entre neovascularización retinal/coroidal y la neovascularización corneal.
7. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la neovascularización retinal/coroidal se selecciona entre miopía, foveas papilares, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, anemia de células falciformes, sarcoidosis, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedades obstructivas carotídeas, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus sistémico eritematoso, retinopatía del prematuro, enfermedad de Eales, retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedad de Bechet, infecciones que causan una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, pars planitis, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones tras cirugía láser, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso, incluyendo todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa, y donde la neovascularización corneal se selecciona entre queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, pterigión, queratitis seca, Sjögren, rosácea del acné, filectenulosis, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto corneal, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, poliarteritis, sarcoidosis de Wegener, escleritis, queratotomía radial penfigoide, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por Herpes simple, infecciones por Herpes zóster, infecciones por protozoos y sarcoma de Kaposi.
8. El análogo de oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que está en forma de una sal.

9. El análogo de oligonucleótidos para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la sal es una sal de sodio, calcio, litio, potasio, amonio, o trialquilamonio.

5 10. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho análogo se formula como una composición farmacéutica con uno o más un vehículo, is farmacéuticamente aceptable is.

10 11. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el que dicho análogo se formula como una composición farmacéutica para su administración mediante inyección.

15 12. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho análogo de oligonucleótido es para su uso en combinación con un agente terapéutico adicional seleccionado entre un agente antineoplásico, un agente alquilante, un agente que es un miembro de la superfamilia de los retinoides, un agente antibiótico, un agente hormonal, un agente derivado de plantas, un agente biológico, una interleucina, un interferón, una citocina, un agente inmunomodulador, un anticuerpo monoclonal, un inhibidor de histona desacetilasa, y un compuesto de platino.

20 13. Uso de un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, de fórmula general 5'-DpG-3' o 5'-GpD-3', en el que D es decitabina; p es un enlazador fosfo; y G es desoxiguanosina, en la producción de un medicamento para tratar uno o más de los siguientes:

25 un tumor benigno seleccionado entre hemangiomas, adenoma hepatocelular, hemangioma cavernoso, hiperplasia nodular focal, neuromas acústicos, neurofibroma, adenoma del conducto biliar, cistanoma del conducto biliar, fibroma, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, hiperplasia regenerativa nodular, tracomas y granulomas piogénicos;

30 proliferación celular anormal debida a lesiones a tejidos corporales durante la cirugía, preferentemente cirugía articular, cirugía intestinal, o cicatrización de queloides;

una enfermedad que produce tejido fibrótico, preferentemente enfisema;

un trastorno del movimiento repetitivo, preferentemente el síndrome del túnel carpiano;

35 una respuesta proliferativa asociada con el trasplante de órganos; y

angiogénesis anormal, o una enfermedad asociada con una angiogénesis no deseada o anormal.

40 14. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dicho análogo o composición farmacéutica del mismo es para la administración en un régimen posológico que comprende un ciclo de tratamiento, comprendiendo dicho ciclo de tratamiento:

45 infusión intravenosa durante de 1 a 24 horas durante de 3 a 5 días por ciclo de tratamiento con una dosis de 0,1 a 1000 mg/m² al día.

50 15. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, de fórmula general 5'-DpG-3' o 5'-GpD-3', en el que D es decitabina; p es un enlazador fosfo; y G es desoxiguanosina, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con la metiación de ADN aberrante,

en el que dicho análogo es para la administración en un régimen posológico que comprende un ciclo de tratamiento, comprendiendo dicho ciclo de tratamiento:

55 infusión intravenosa durante de 1 a 24 horas durante de 3 a 5 días por ciclo de tratamiento con una dosis de 0,1 a 1000 mg/m² al día.

60 16. Un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 o reivindicación 15 en el que el ciclo de tratamiento comprende infusión intravenosa durante de 1 a 24 horas durante de 3 a 5 días por ciclo de tratamiento con una dosis de 1 a 100 mg/m² al día.

17. Una formulación que comprende:

(i) un análogo de oligonucleótido aislado o sintético, o una sal o éster del mismo, de fórmula general 5'-DpG-3' o 5'-GpD-3' en el que D es decitabina; p es un enlazador fosfo; y G es desoxiguanosina; y

(ii) una vacuna contra el cáncer.

65

18. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 17 que comprende además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

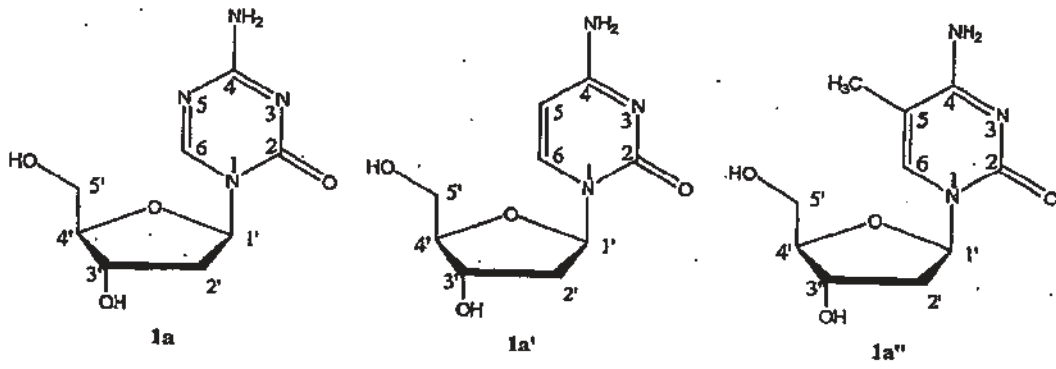


FIGURA 1

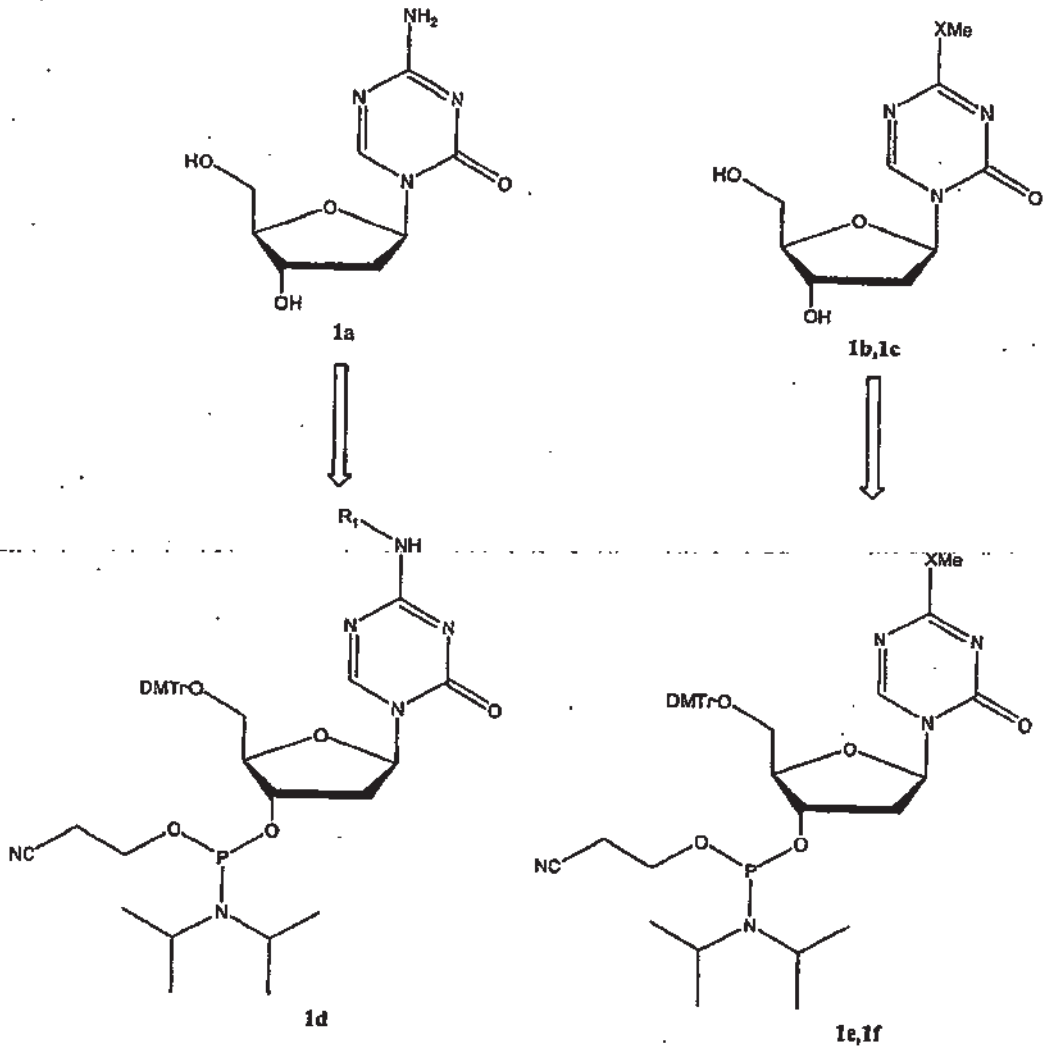


FIGURA 2A

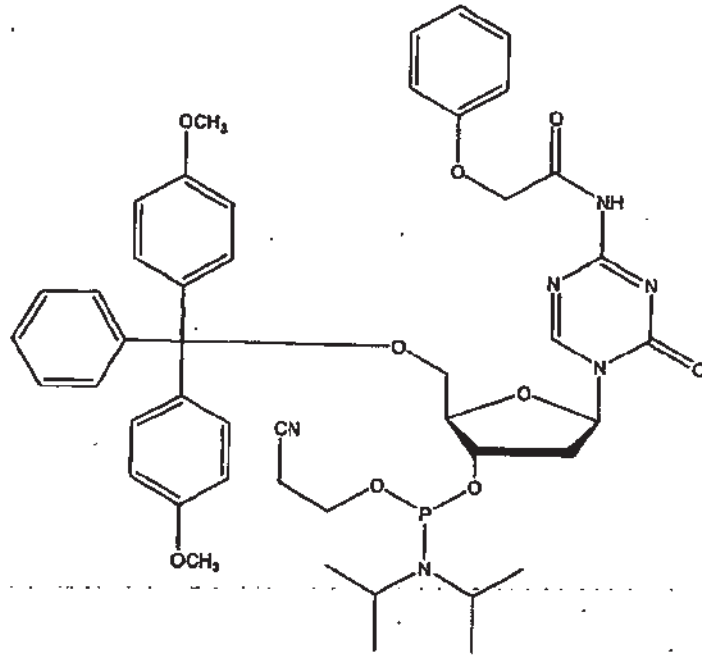


FIGURA 2B

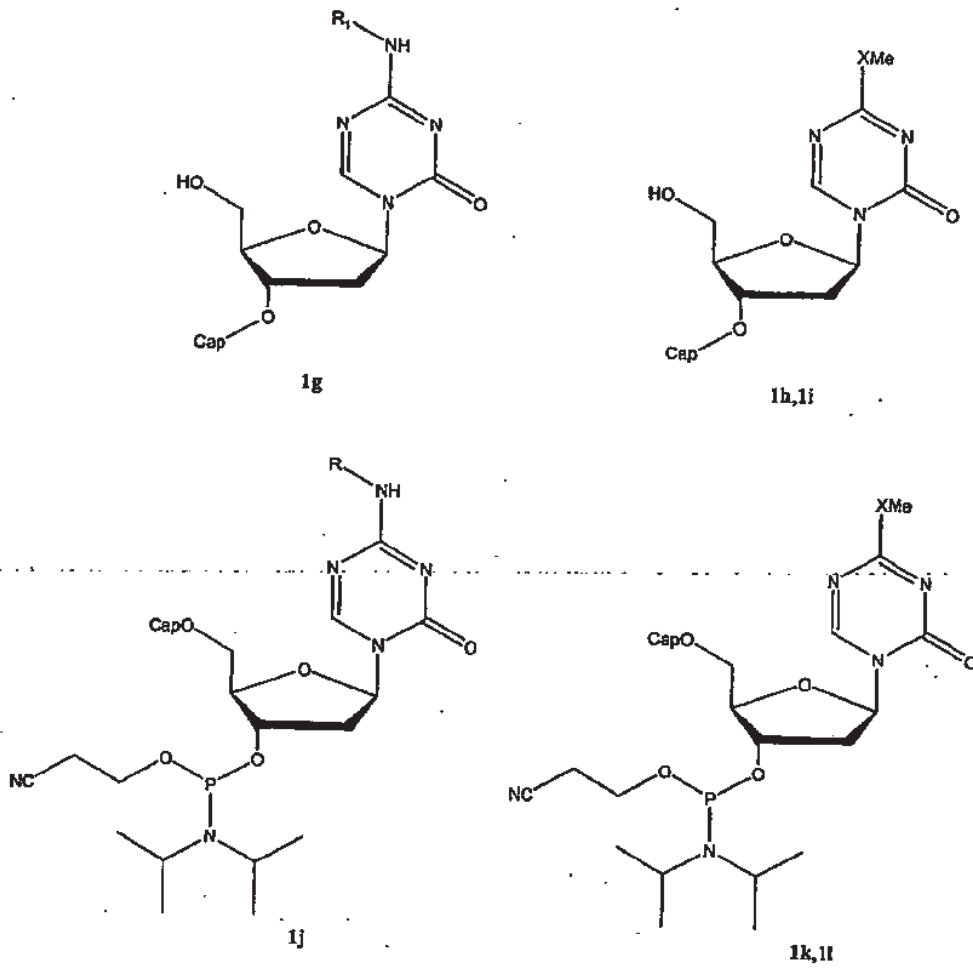


FIGURA 3A

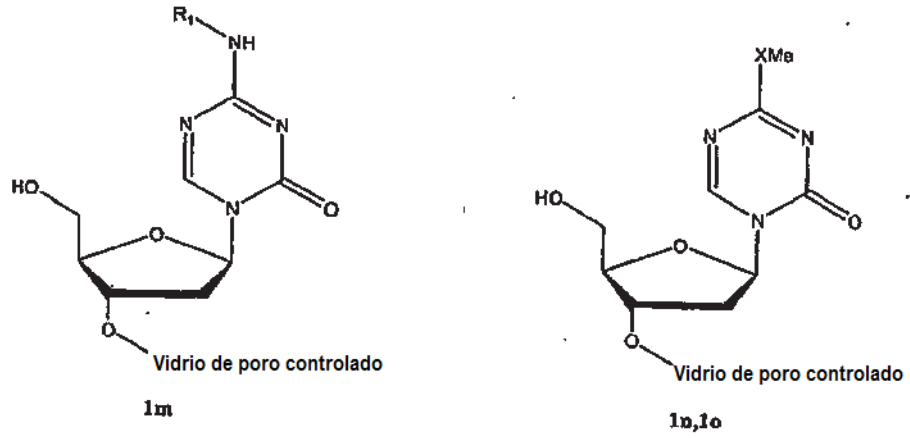


FIGURA 3B

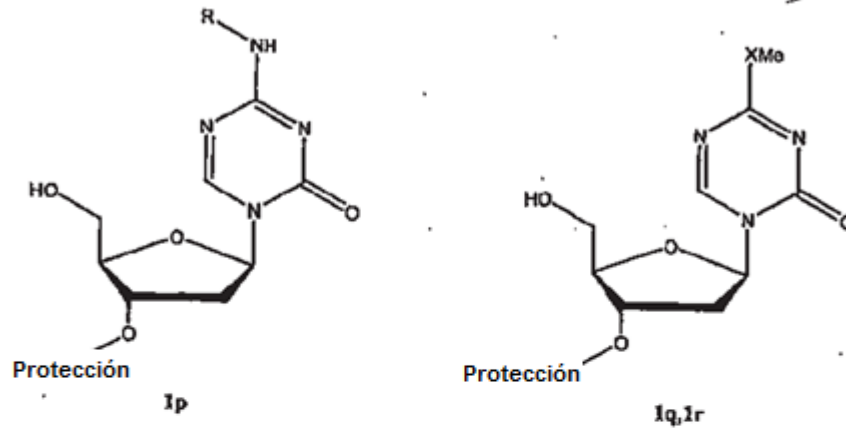


FIGURA 4

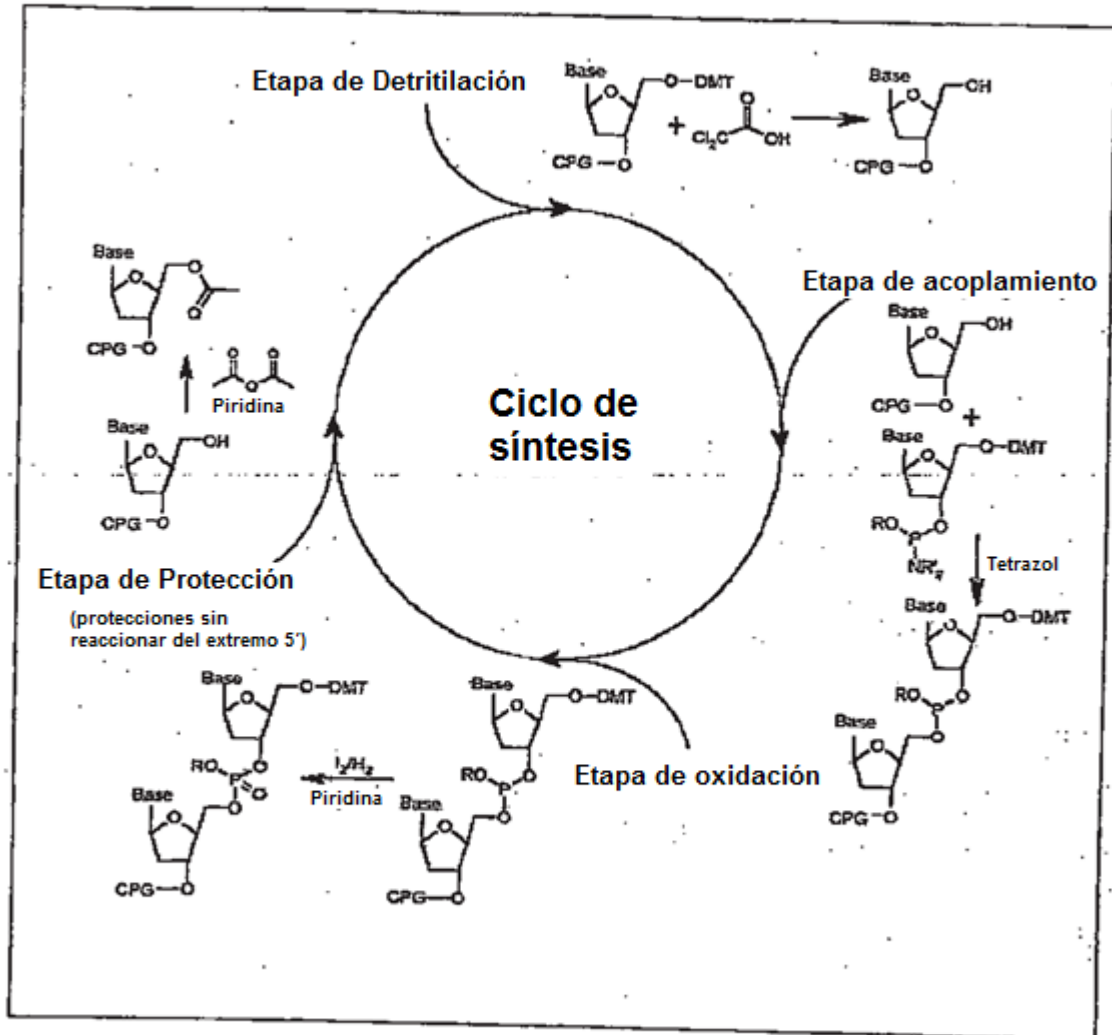


FIGURA 5

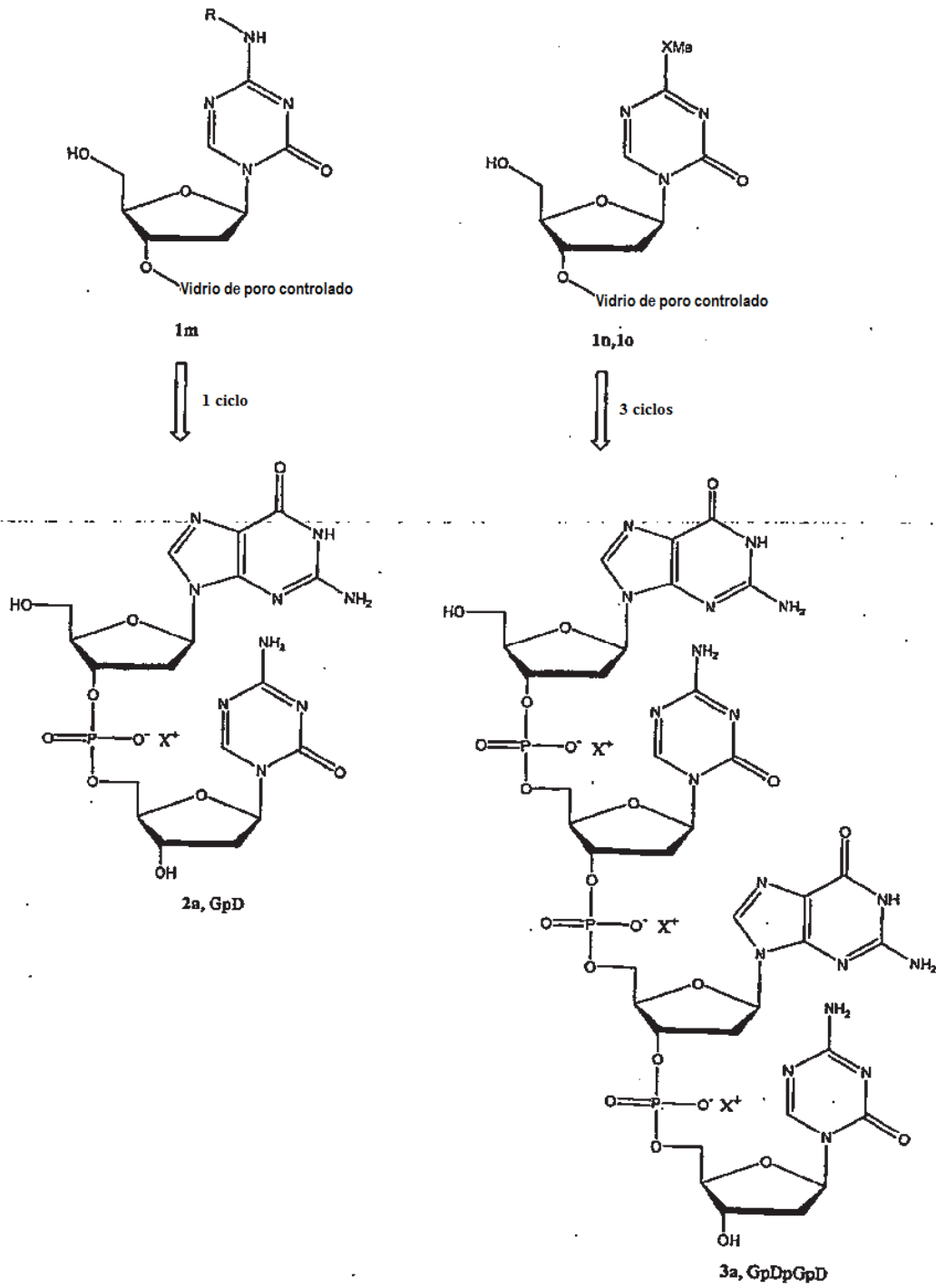


FIGURA 6A

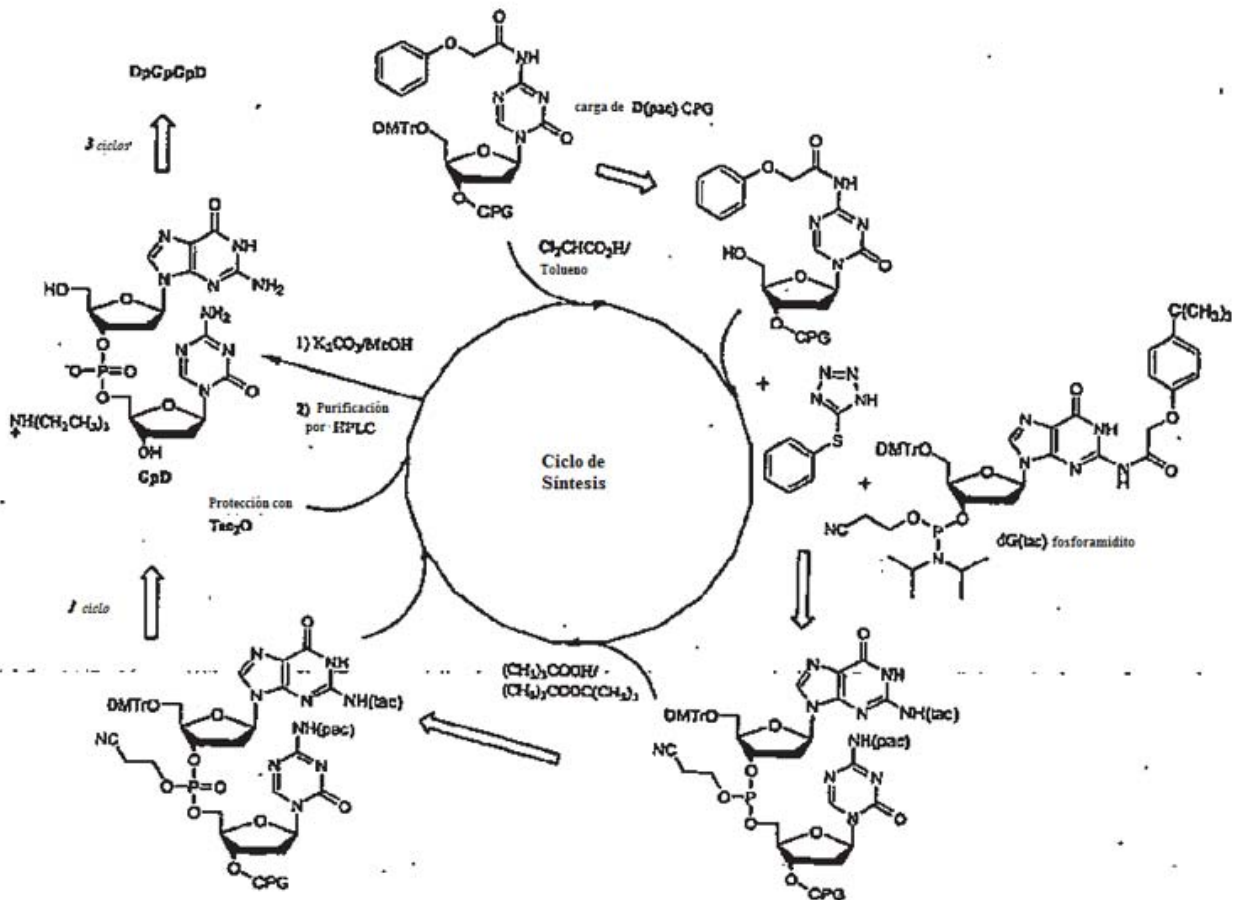


FIGURA 6B

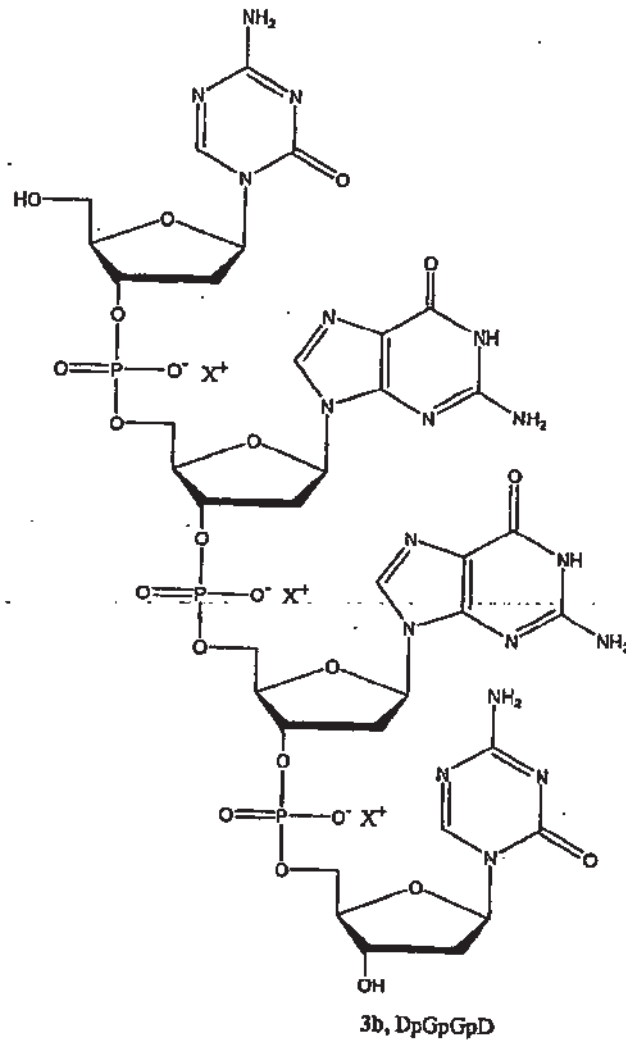


FIGURA 7

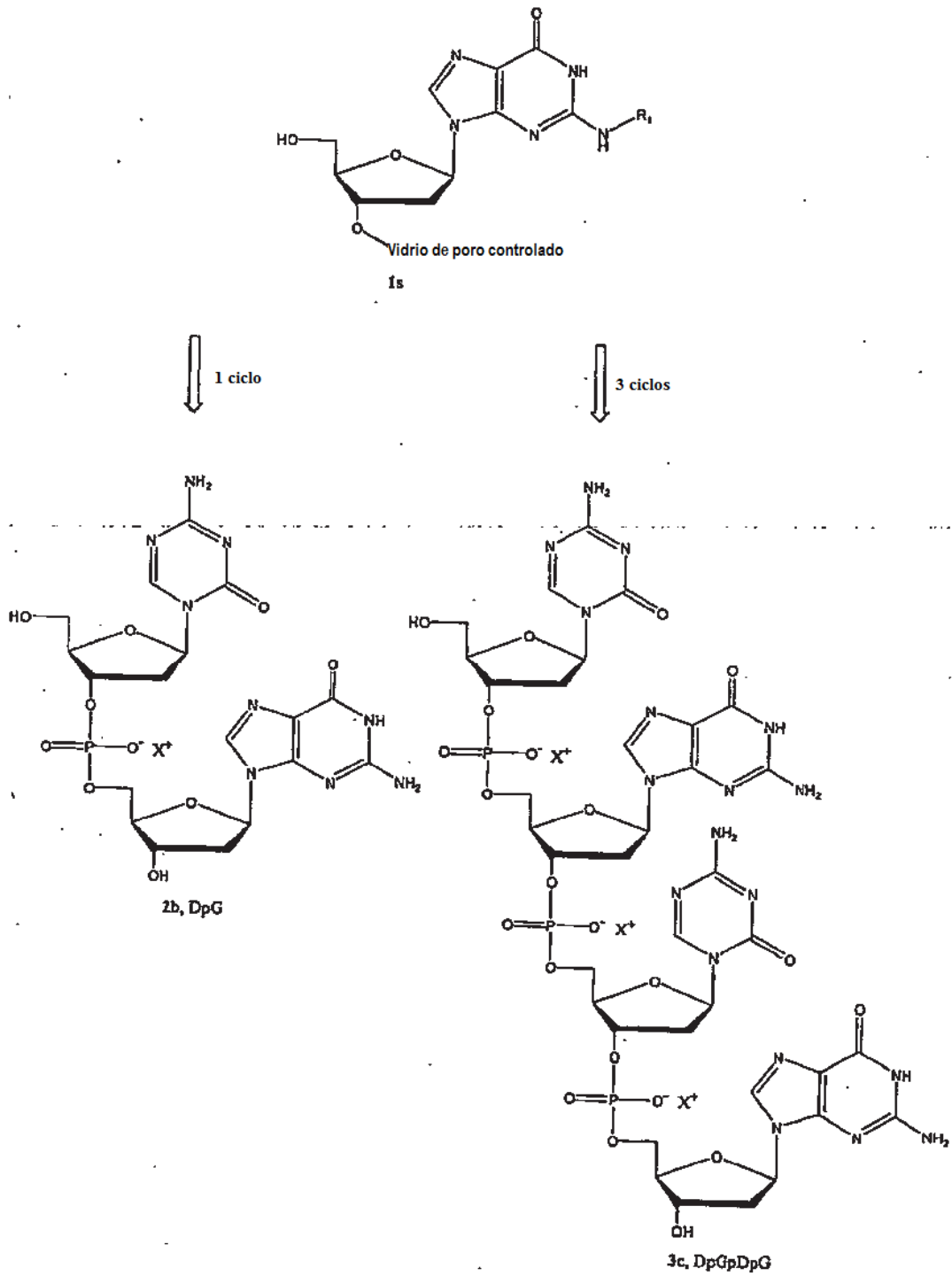


FIGURA 8

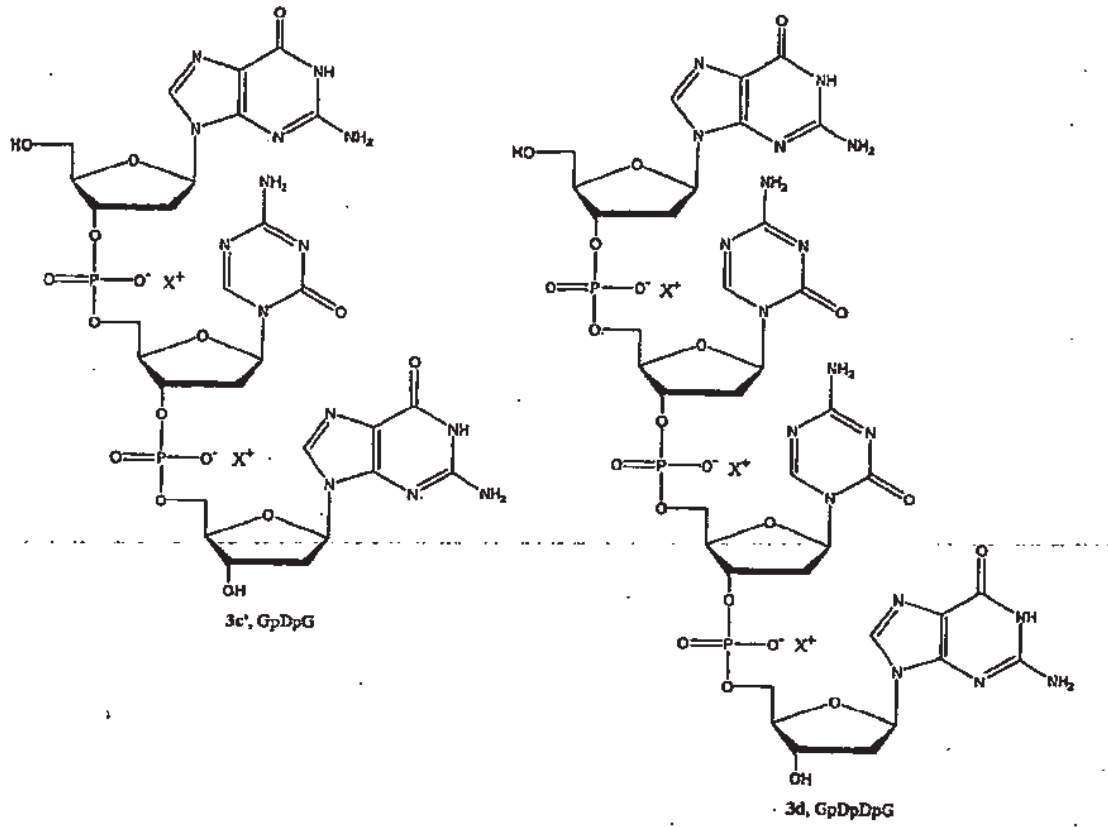


FIGURA 9

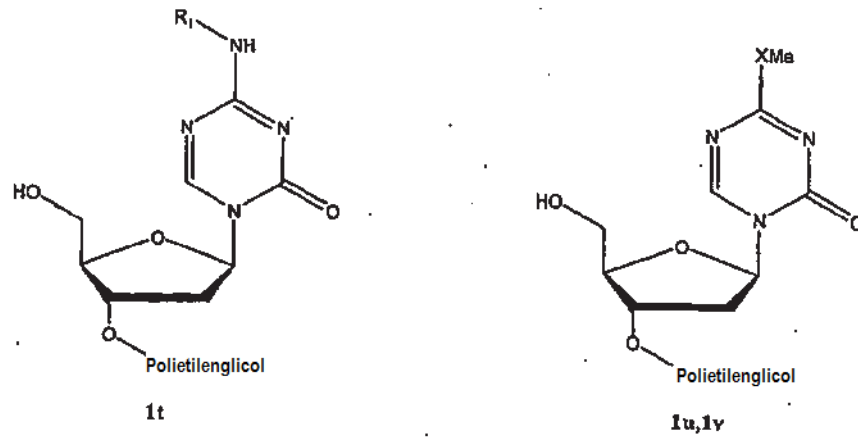


FIGURA 10

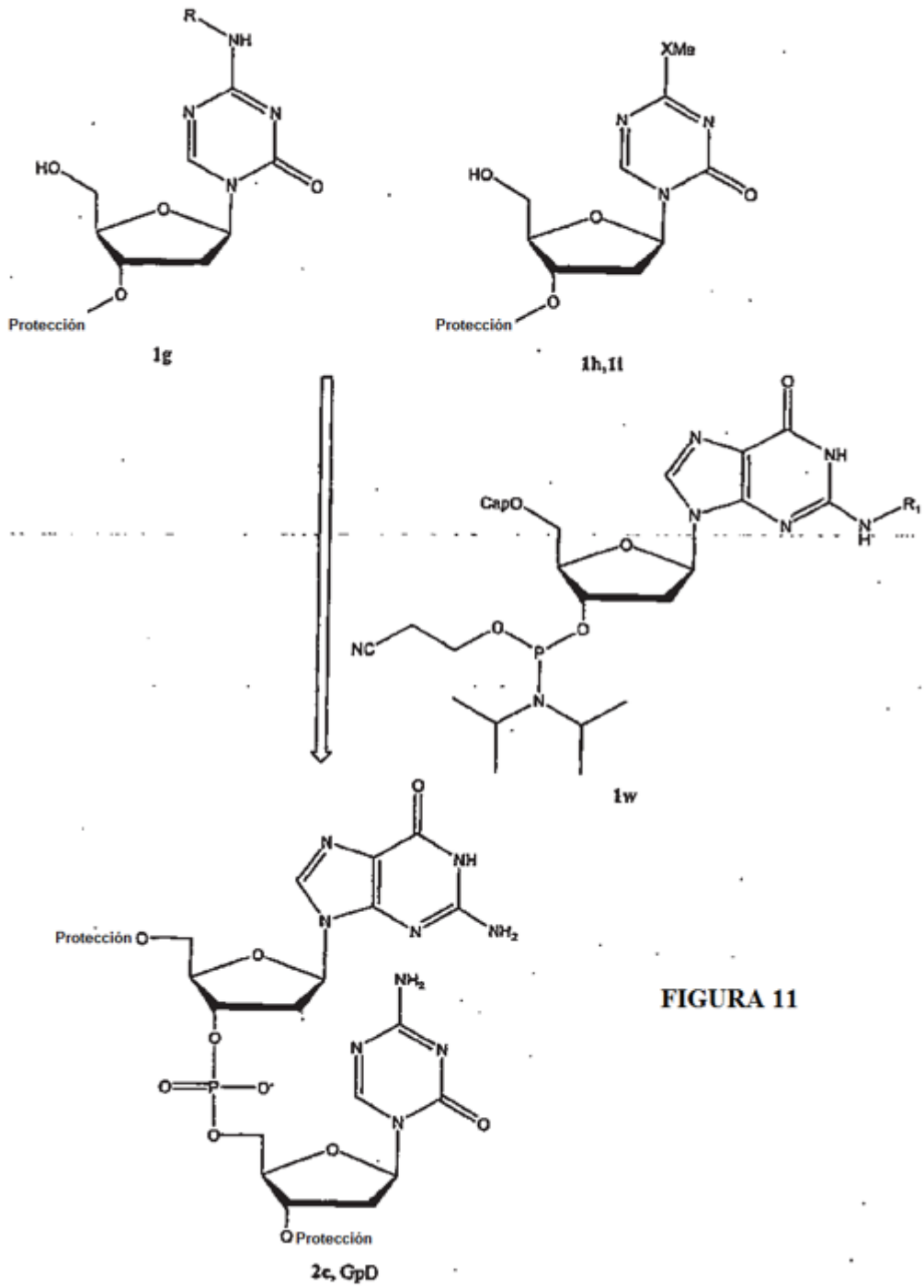


FIGURA 11

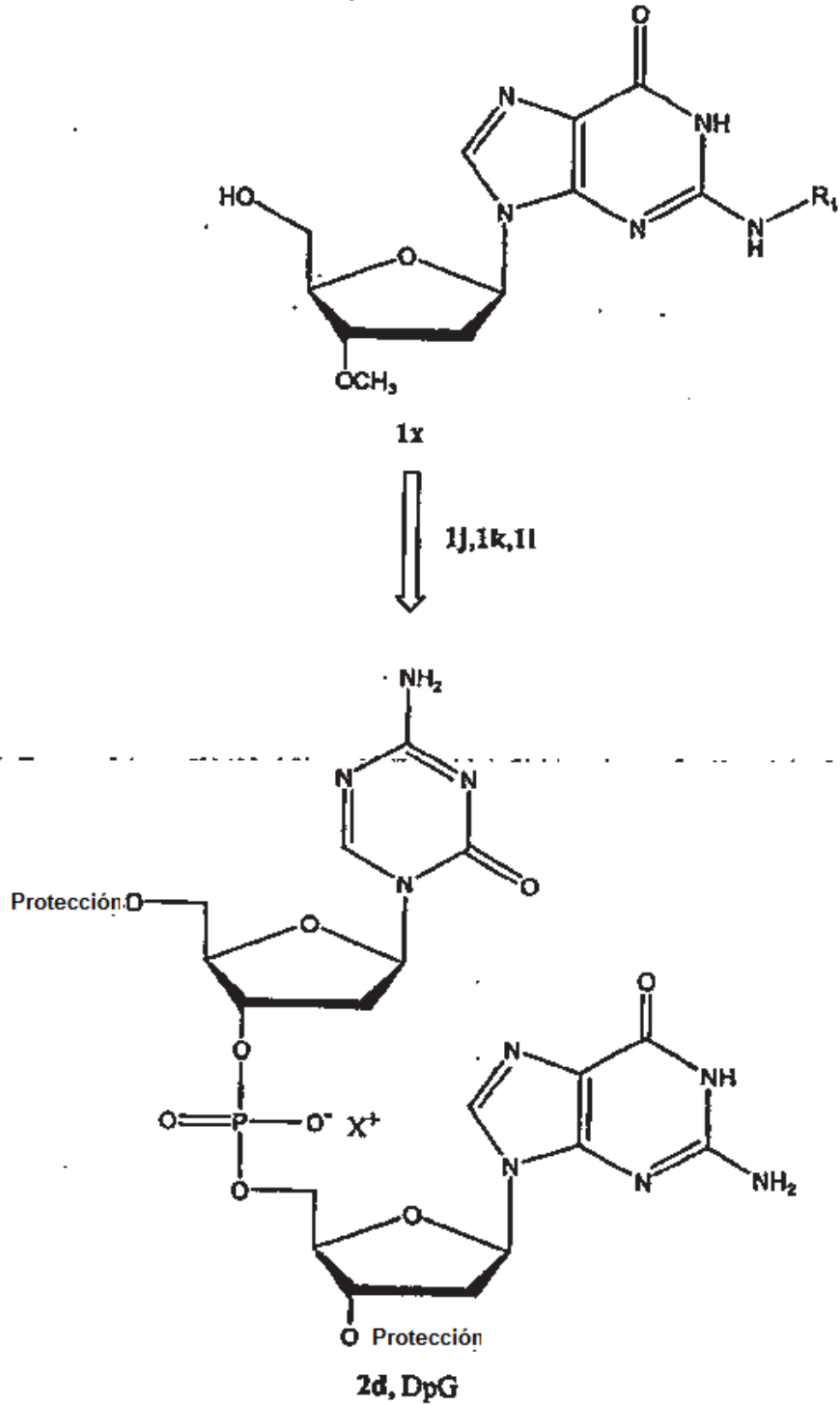


FIGURA 12

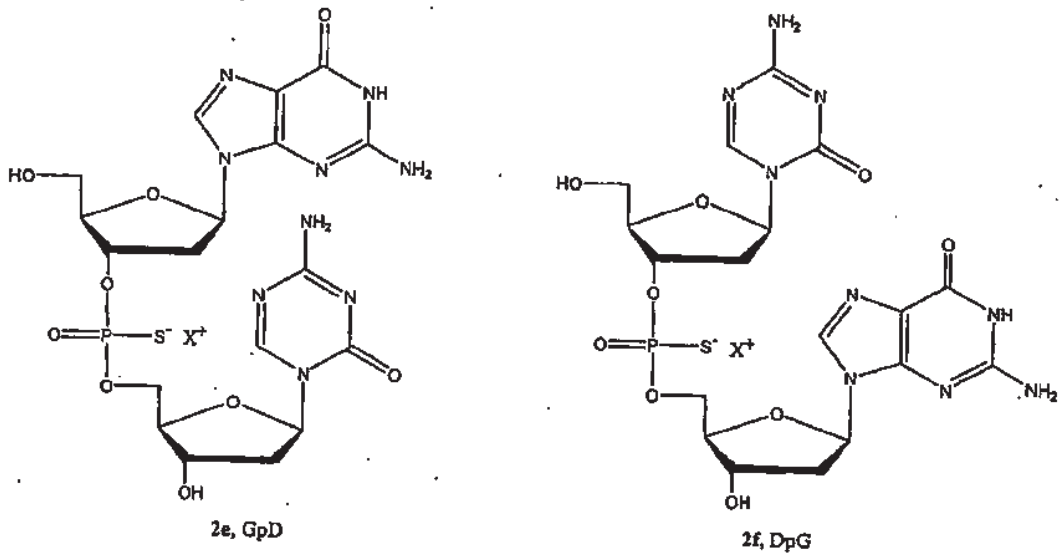


FIGURA 13

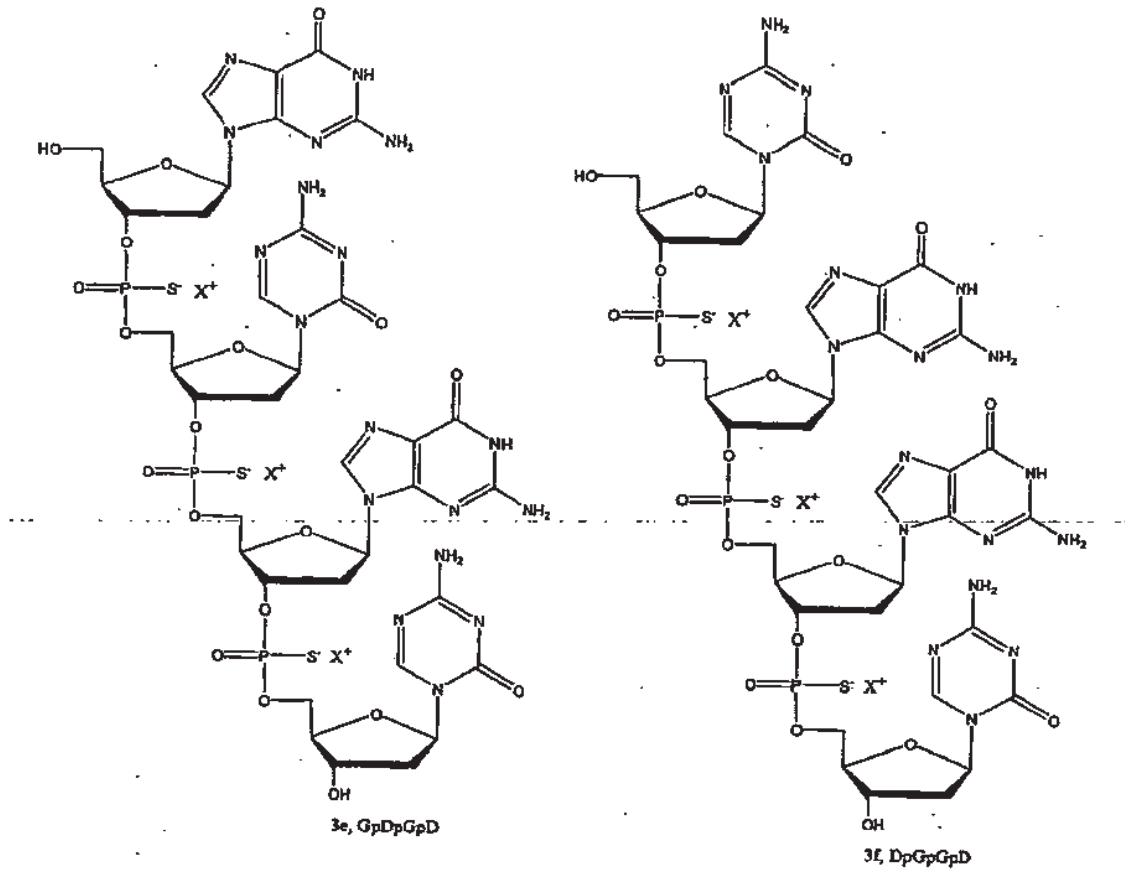


FIGURA 14

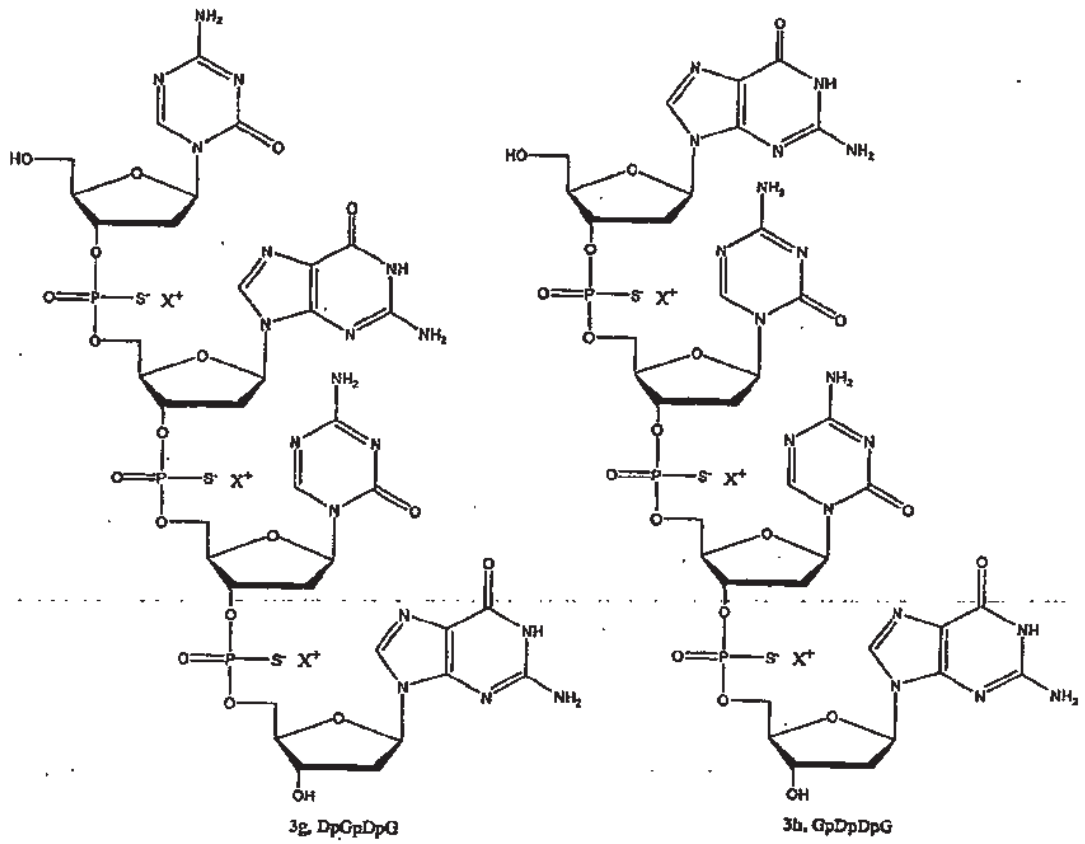


FIGURA 15

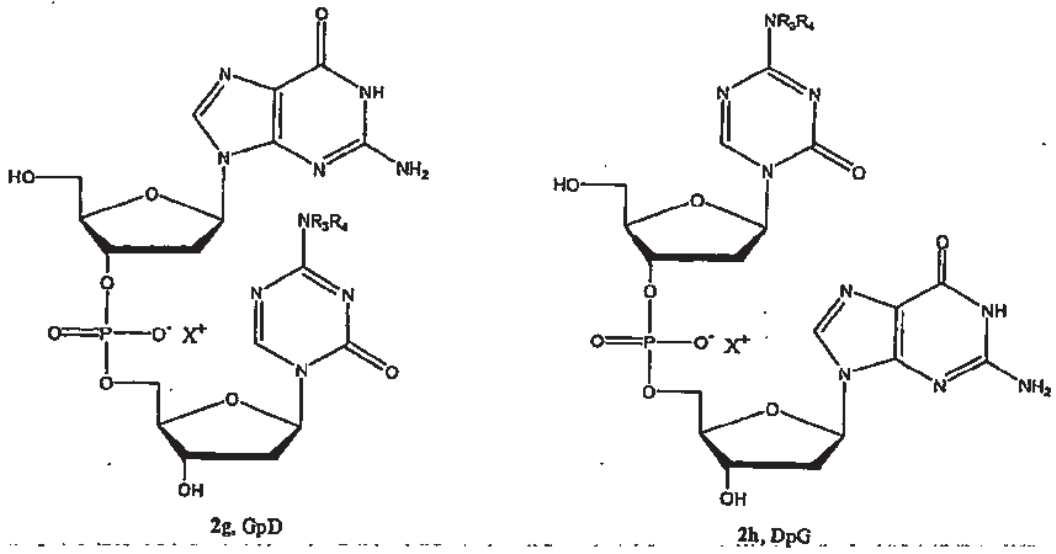


FIGURA 16

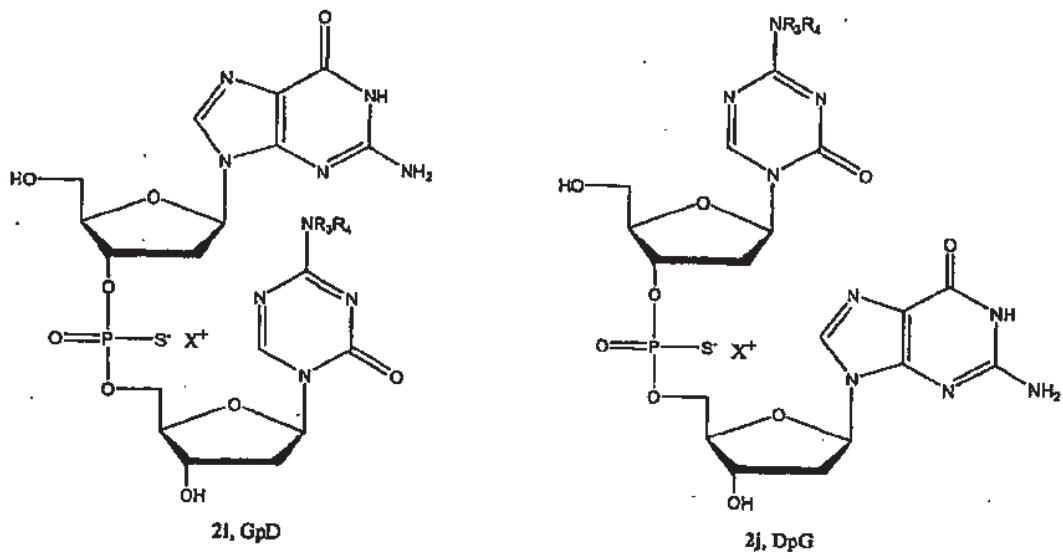


FIGURA 17

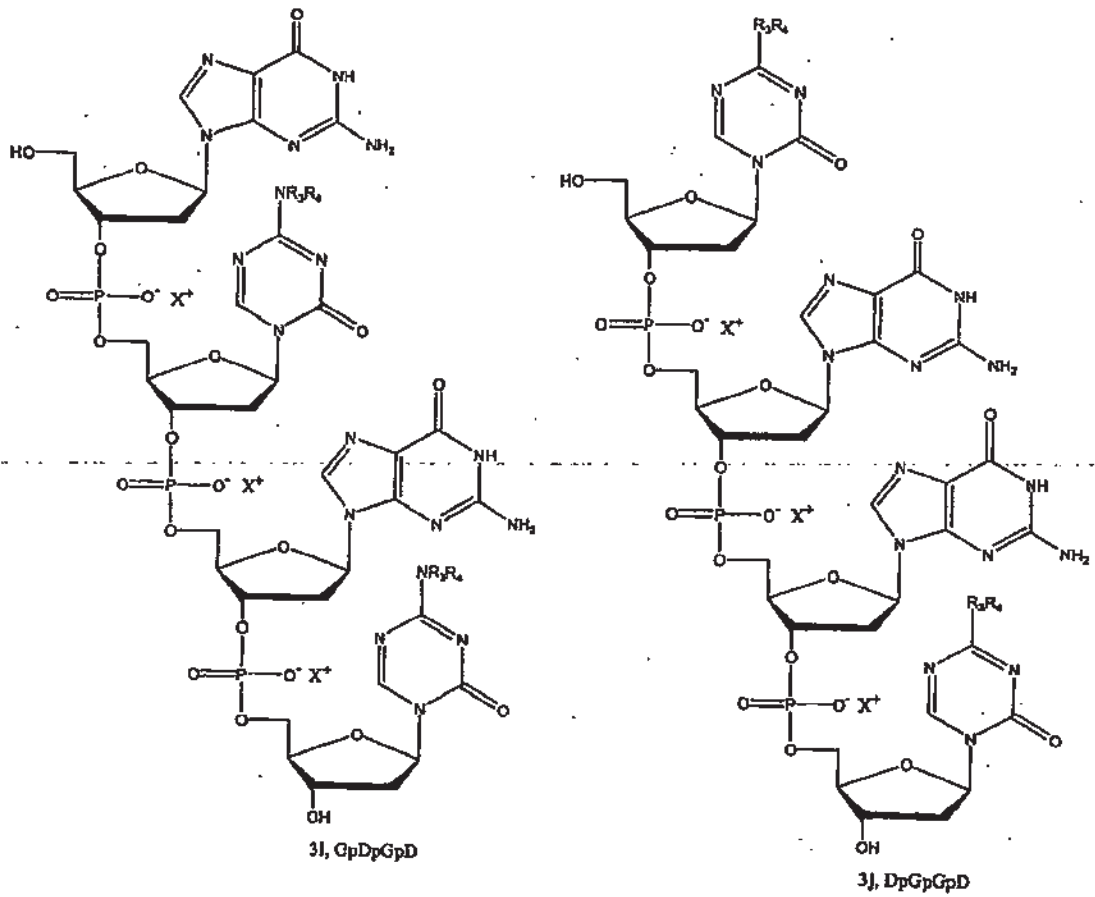


FIGURA 18

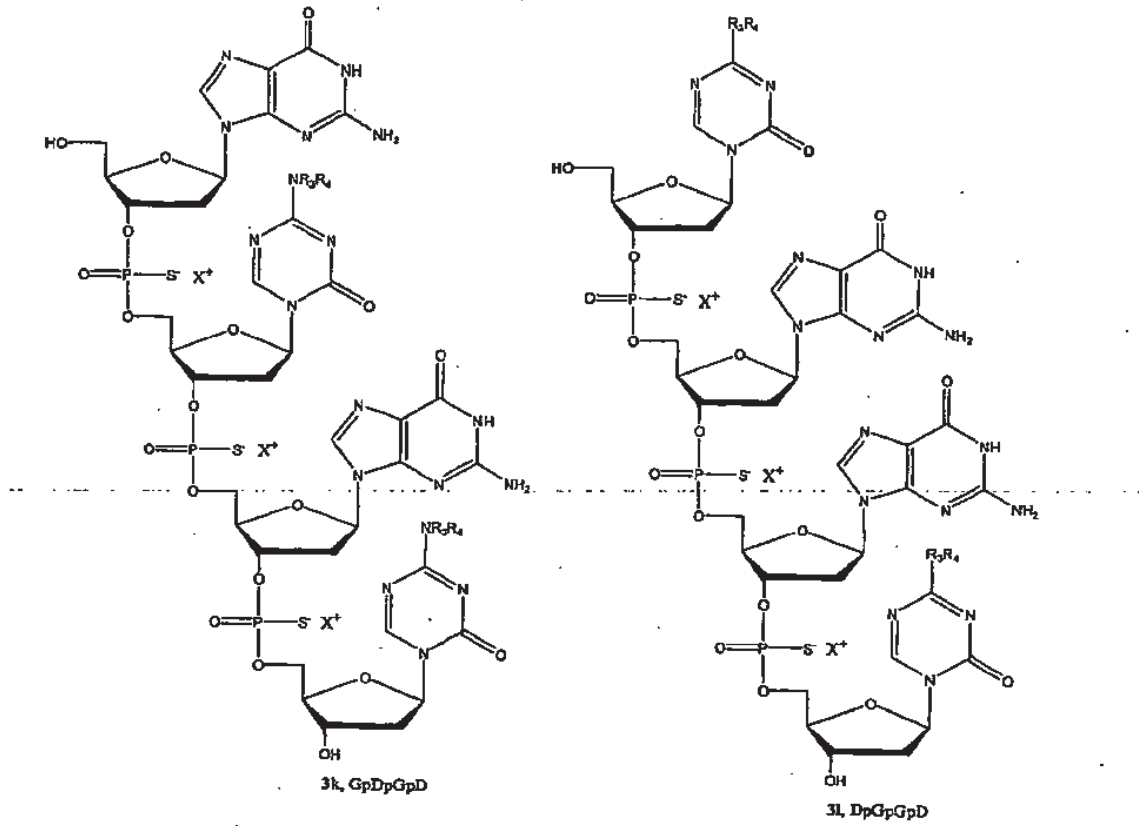


FIGURA 19

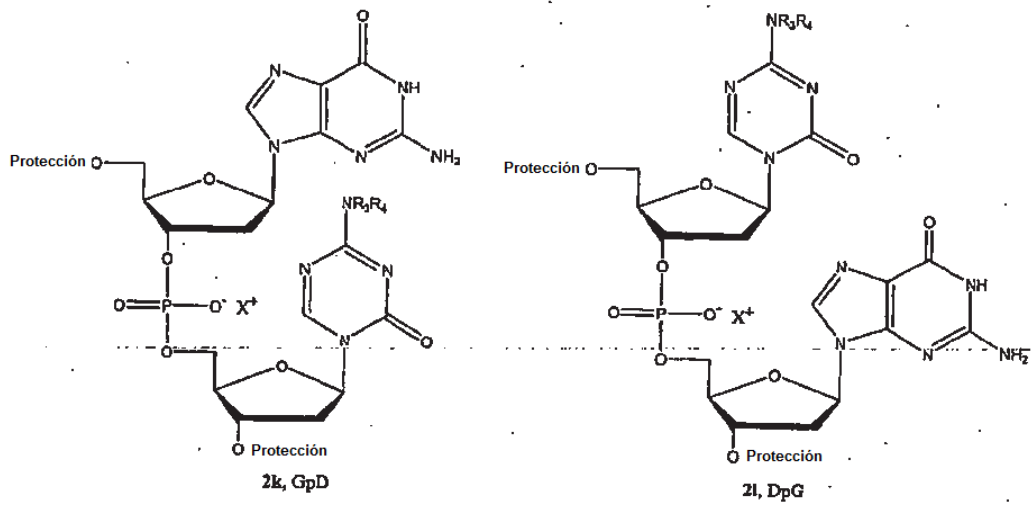


FIGURA 20

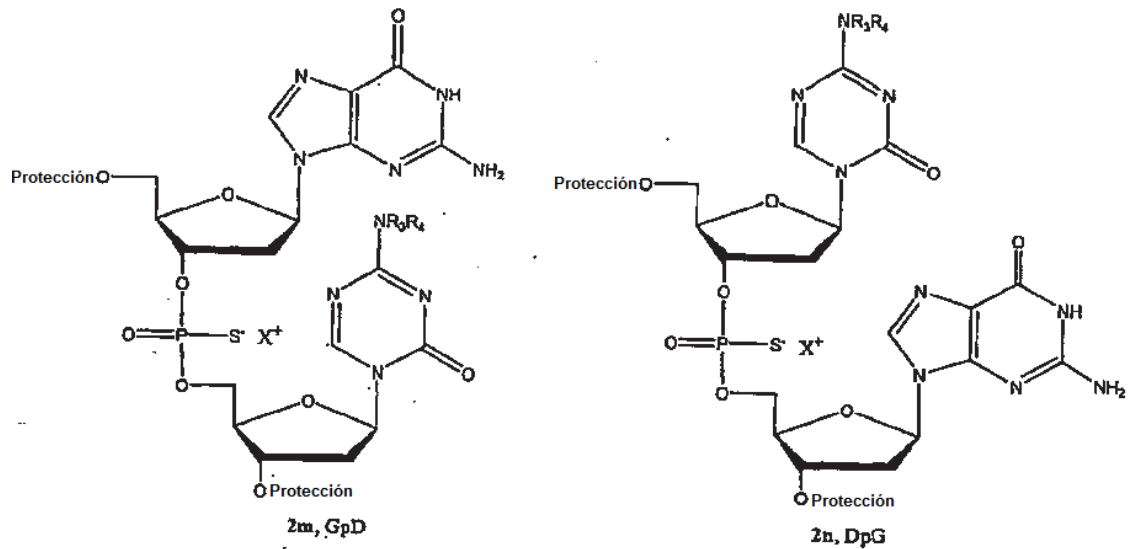


FIGURA 21

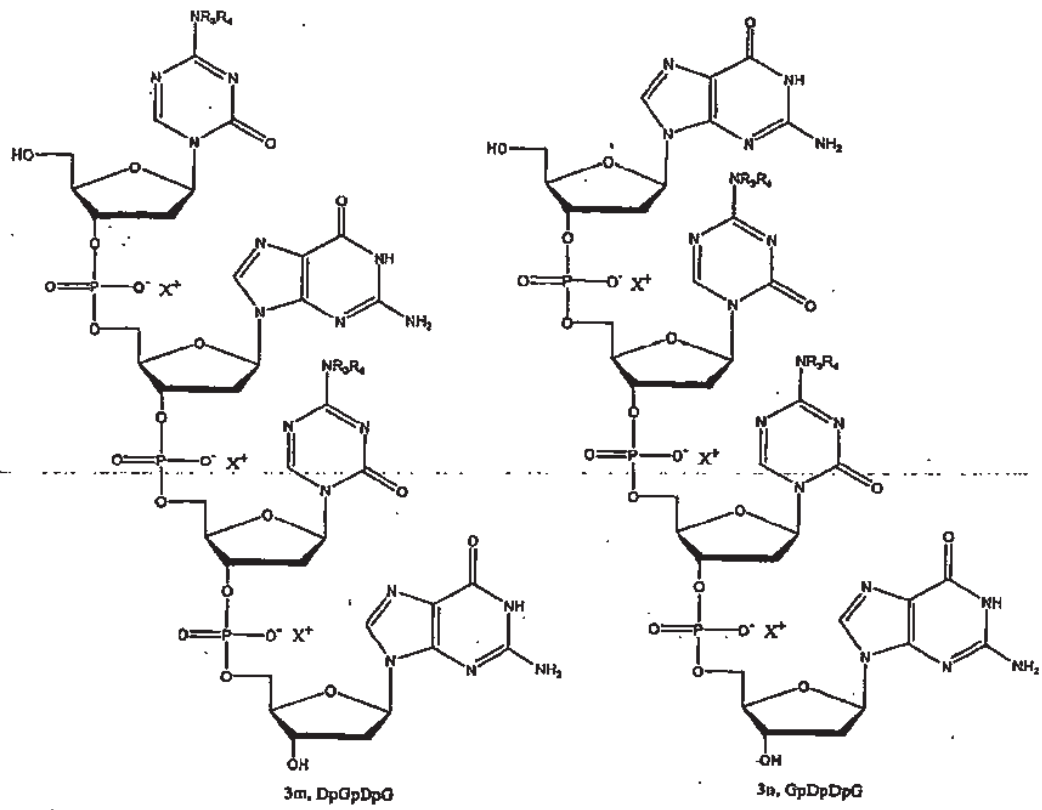


FIGURA 22

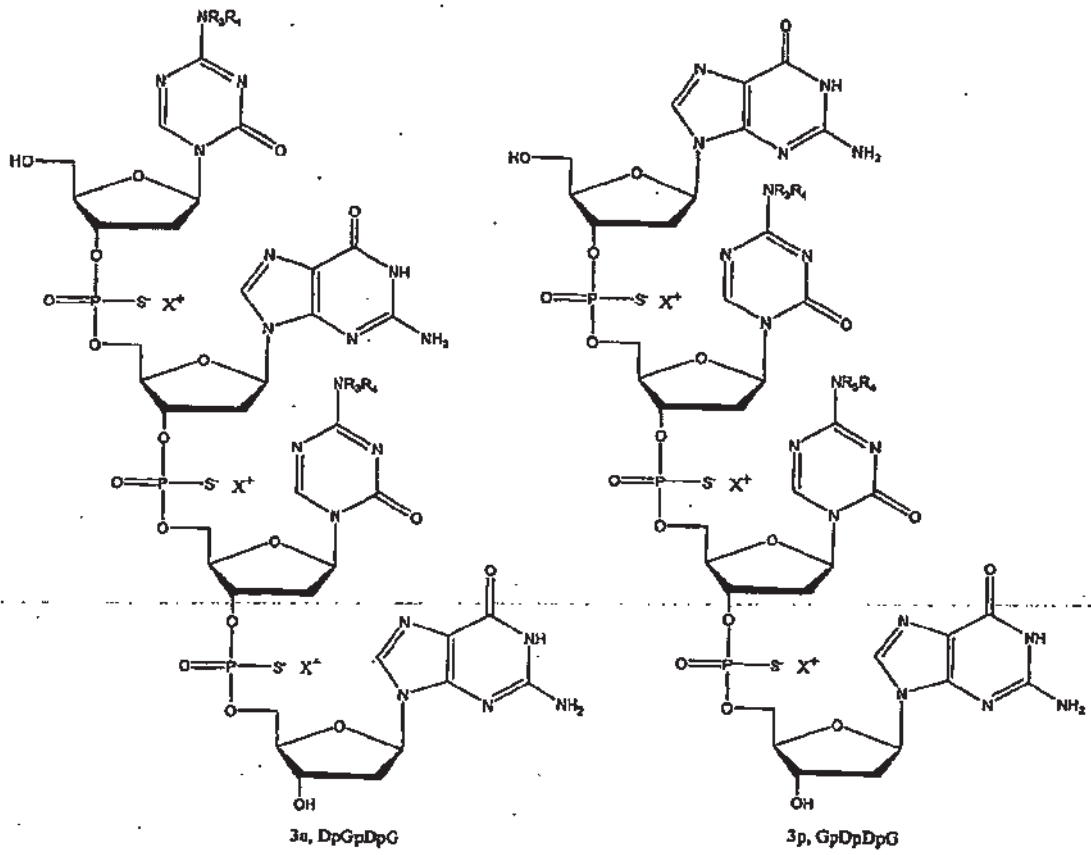
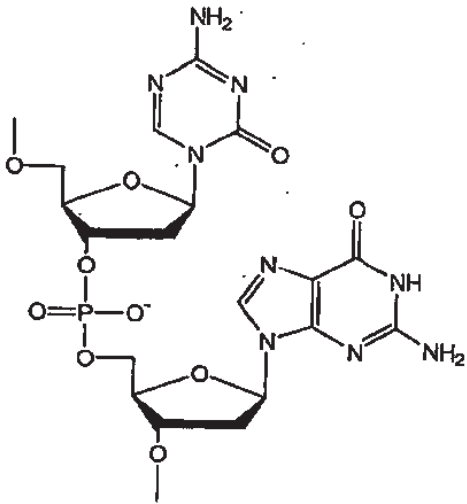
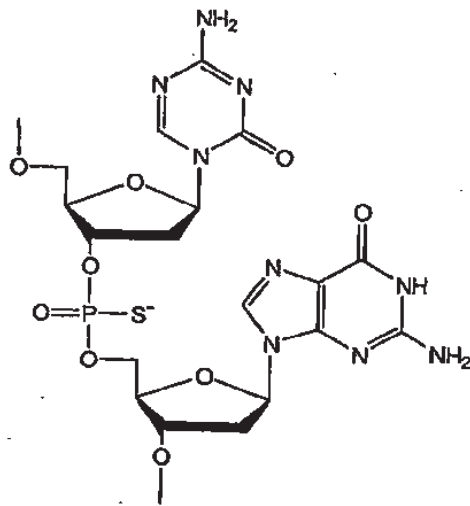


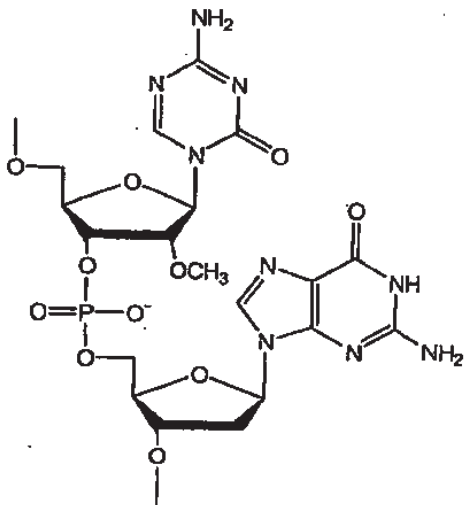
FIGURA 23



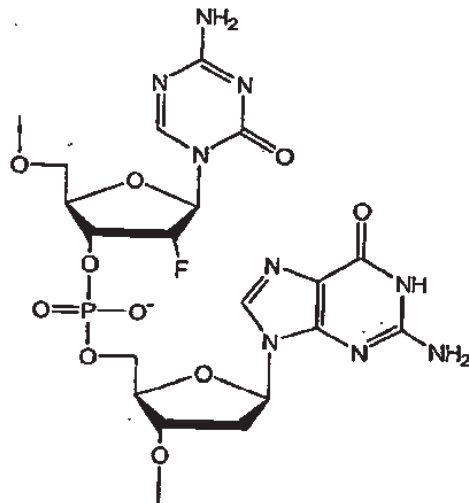
Islote-DpG-
con Estructura de fosfodiéster Natural



Islote-DdG-
con Estructura de Fosforotioato

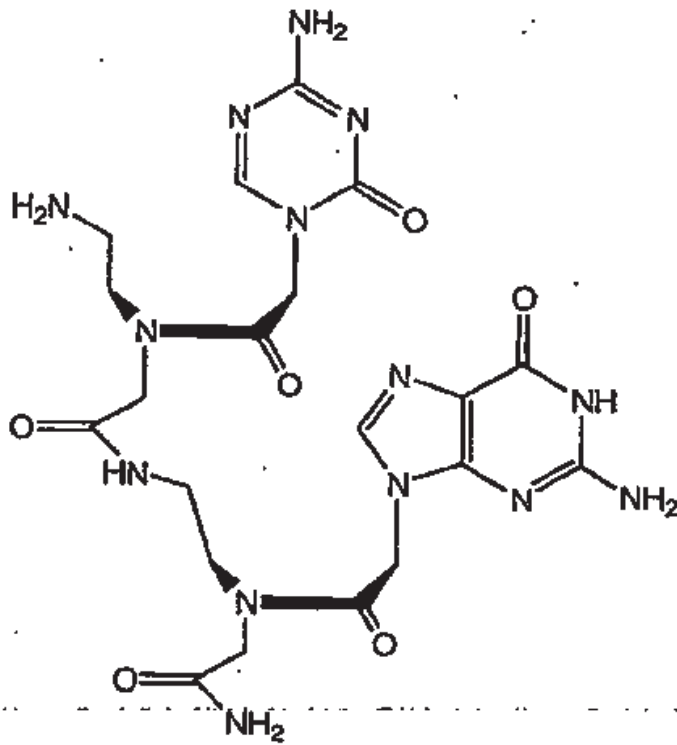


Islote-DpG- con Estructura de Fosfodiéster 2'- Metoxirribosa



Islote-DpG- con Estructura de Fosfodiéster 2'-Fluororribosa

FIGURA 24A



Islote -DpG- con Estructura peptídica

FIGURA 24B

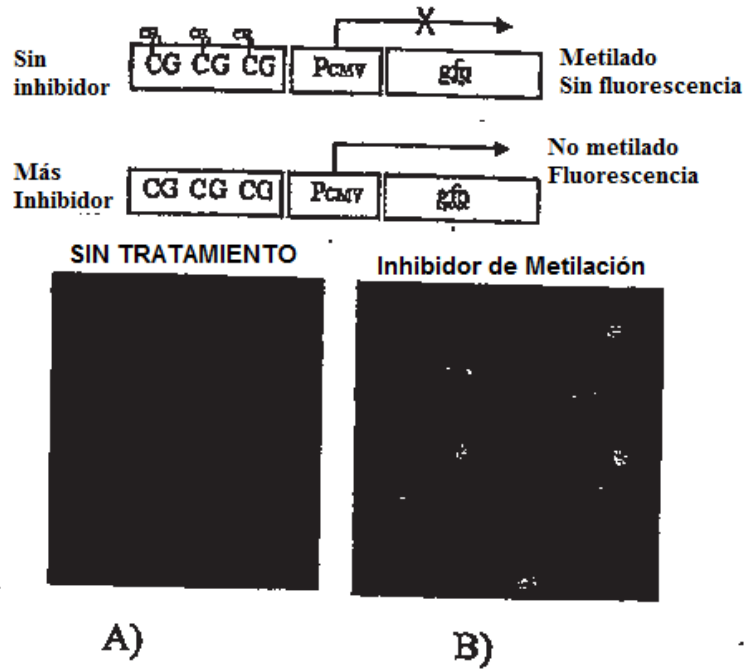


FIGURA 25

SEC ID N°: 1	TpTpDpxGpDpxGpApA
SEC ID N°: 2	TpGpxCpCpTpDpxGpT
SEC ID N°: 3	ApGpGpxDpApCpApGpxDpA
SEC ID N°: 4	GpTpGpxDpApGpxDpA
SEC ID N°: 5	ApApDpxGpGpGpxDpGpGpxDpGpG
SEC ID N°: 6	CpApDpxGpGpxDpGpxDpGpG

FIGURA 26

REGIÓN DE SECUENCIA PROMOTORA P15 (SEC ID N°:7)

tttttcattcagtcaccttgcttcgcaagctcacacatctgcctcgtgcaagattctcagtcattttac
 ttagtcattgggtctttccctatcaccattctttatgtcccccctcaagaaaaacattatcttccatttcccttatacact
 ccaaacagctttcattttttctgacatatttactacctaagaaaaatggctcaagaattgggtagactatcttgccttaact
 tttctgataagtttcagagaaactcaagggtcaaaacaagagcataagagtaaaggtagagaaattaagaaactgagac
 taggaaaatgggggtgggatgggaaagaaaaagaaattgttataatgctaccgggtcccttccctgtccaggtggattt
 cagctctgttgaggctctgtcagtagatattcagccctaaccagcacttccatgggtggggcacttccactgccccttaa
 aagaaagagcttttttaattctacagggatttgggggatgagggtcagagctaagggtatcctaaaaaaacatgtgaa
 gactctcattttgcaatacacaaagcaattgcctcctgttaagactttgtcttctcagcactccgaacaaaaatgattc
 tgaatacaaaaaatgttcaacttttaggagaggtccacttatgcagttcctcaccaaagtttttaggcaacaaatccataa
 ctgggggttctctcctatccaatgtagcatccgctgaaatgttttaaatattttaagtaataatgttgattcaaacctc
 acctaggaagatttaggaaggggaaaaaagcacttggcatttaaatcttcagaagagaatttaatgacaggttcagcctg
 tttaatgacaagcccagcaccaccccctctcttatgatgtttcatttactgcaataatttccctttactcatgat
 aataaaaaataagataacctgacaaaatgggttttaaataggtaagagtgcaacaaagatttactgtcaaaaatgatgaa
 actgggatctcagattcttaaagtaataattttttgtcttatgtgtccaggttggcactctcaatctogaactagttt
 tttctcttttaaggggtgtatccataatgcaaaaaatggaaagaattaaaaagcacacgcaaaaatgattctcgggatt
 ttctctatttttatgggtgactaattcaaacagaaagcacatccaagagaaaattgctaagtttgatacaagttatga
 aacttgtgaagcccaagtaactgcctggggatgaatttaacttgtatgacaggtgcagagctgtcgtttcagacatctta
 agaaagacgggagttattttgaatgactttctctcgggtcacaagggagccaccaacgctctccacagtgaaacaaactggct
 ggctgaagggaacagaaatcctctgctccgctactggggatttaggagctgagggcagtggtgaaacattcccaaaaatatta
 gccttggctttactggacatccagcagcagtgccagccagcattcctggcggtccctggcccagctctcggcgcatgcg
 tccctagcattcttgggcaggtctcccgcctcgtgacgctcggcccgggctggcctcccgcgatcacagcgggacag
 gggcgagcctaaaggggtggggagacgcccggccccttggcccagctgaaaaagaaatctttgcccgttggctcccca
 ctctgcccagagcagggcgggcagtgaggactccgcgacgctccgcaacctcggccagagcggctttgagctcggctg
 cgtccgctagggccttttcccagaagcaatccaggcgcgcccggctgttcttgagcgcagggaaagcccgggagct
 acgaccggcggctcggccactgcaagggcccccagccgcagaaaggaagcgggagggtaatgaagctgagcccaggtct
 cctaggaagggagagagtgccgagcagcgtgggaaaggaaggaagagtgctgtaagttacggccaaacgggtggatta
 tccgggcccgtgcccgtctgggggtgcccgaatgcccagggagaaacaaagggcatgccagtgggggcggcagcg

- SEC ID N°: 8 TCCGCAA
- SEC ID N°: 9 TCCCTCGT
- SEC ID N°: 10 TCCCGGCT
- SEC ID N°: 11 CGGCCCGG
- SEC ID N°: 12 GCTCGGCT

FIGURA 27

SECUENCIA DE REGIÓN PROMOTORA (SEC ID N°:13)

cggagagggggagaacagacaaaggggcggggggagcagcatggagcggcggcggggagcagcatggag
 ccttcggctgactggctggccaaggccggcccgggcccggggtcgggtagaggaggtgcggcgctgctggaggcggggcgct
 gcccAACGCACCGAATAGTTACGGTCGGAGGCCGATCCAGGTCATGATGATGGGCAGCGCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGC
 TGCTCCACGGCGCGGAGCCCAACTGCGCCGACCCCGCCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTC
 CTGGACACGCTGGTGGTGTGCACCGGGCCGGGGCGGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGGCCGTCTGCCCGTGGACCT
 GGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTGCGACGGTACCTGCGCGCGGCTGCGGGGGGCACCCAGAGGCAGTAACCATGCC
 GCATAGATGCCGCGGAAGTCCCTCAGACATCCCGATTGAAAGAACCCAGAGGGCTCTGAGAAACCTCGGGAACTTAG
 ATCATCAGTCACCGAAGTCCCTACAGGGCCCAACTGCCCCCGCCACAACCACCCCGCTTCGtagtTTTCATTtagaa
 AATAGAGCTTTTAAAAATGTCCTGCCTTTTAACTAGATATAAGCCTTCCCCACTACCGTAAATGTCCATTtatcat
 TTTTatatattcttataaaaaagtataaaagaaaaacaccgcttctgccttttactgtgtggagt
 TCTGGAGTGAGCACTCACGCCATAAGCGCACATTCATGTGGCATTCTTGCAGCCCTCGCAGCCTCGGAAGCTGTGGA
 CTTcatgacaagcattttgtgaactagggagctcaggggggttactggcttctcttgagtCACACTGTAGCAAATGGC
 agaaccaaagctcaataaaaaataaaataattttcattcattcactc

- SEC ID N° : 14 AACGGGCGGCGG
- SEC ID N° : 15 CACGGCGCGG
- SEC ID N° : 16 CGGGCGGC
- SEC ID N° : 17 AGCAGCAT
- SEC ID N° : 18 GCGCCGAC

FIGURA 28

SECUENCIA DE REGIÓN PROMOTORA DE BRCA 1 (SEC ID N°:19)

ccacctaattgtactgaattgcaaatgatagttgttctagcagtgaagagataaagaaaaaaaaagtaca
accaaattgccagtcaggcacagcagaaacctacaactcatggaaggtaaagaacctgcaactggagccaagaagagtaac
aagccaaatgaacagacaagtaaaagacatgacagcagatacttcccagagctgaagttaacaaatgcacctggttcttt
tactaagtgttcaaataccagtgaaactaaagaatttgtcaatcctagccttccaagagagaagaaaaagaagaaaactag
aacagttagtgtctaataatgctgaagaccccaaagatctcatgtaagtggagaaagggttttgcaactgaaagatc
tgtagagagtagcagttatcatgtgtacctggtagctgattatggcactcaggaaagtatctcgttactggaagttagca
ctctagggaggcaaaaacagaaccaaataaatgtgtgagtcagtggtgcagcatttgaaaacccaagggaactaattcat
ggtgttccaagataatagaaatgacacagaaggctttaagtatccattgggacatgaagttaccacagtcgggaaac
aagcatagaaatggaagaa

SEC ID N°:20 AGGCACAGCA
SEC ID N°:21 GTGCAGCA
SEC ID N°:22 CAGCGATA
SEC ID N°:23 TAGCAGTG
SEC ID N°:24 AGGCTTTA

FIGURA 29

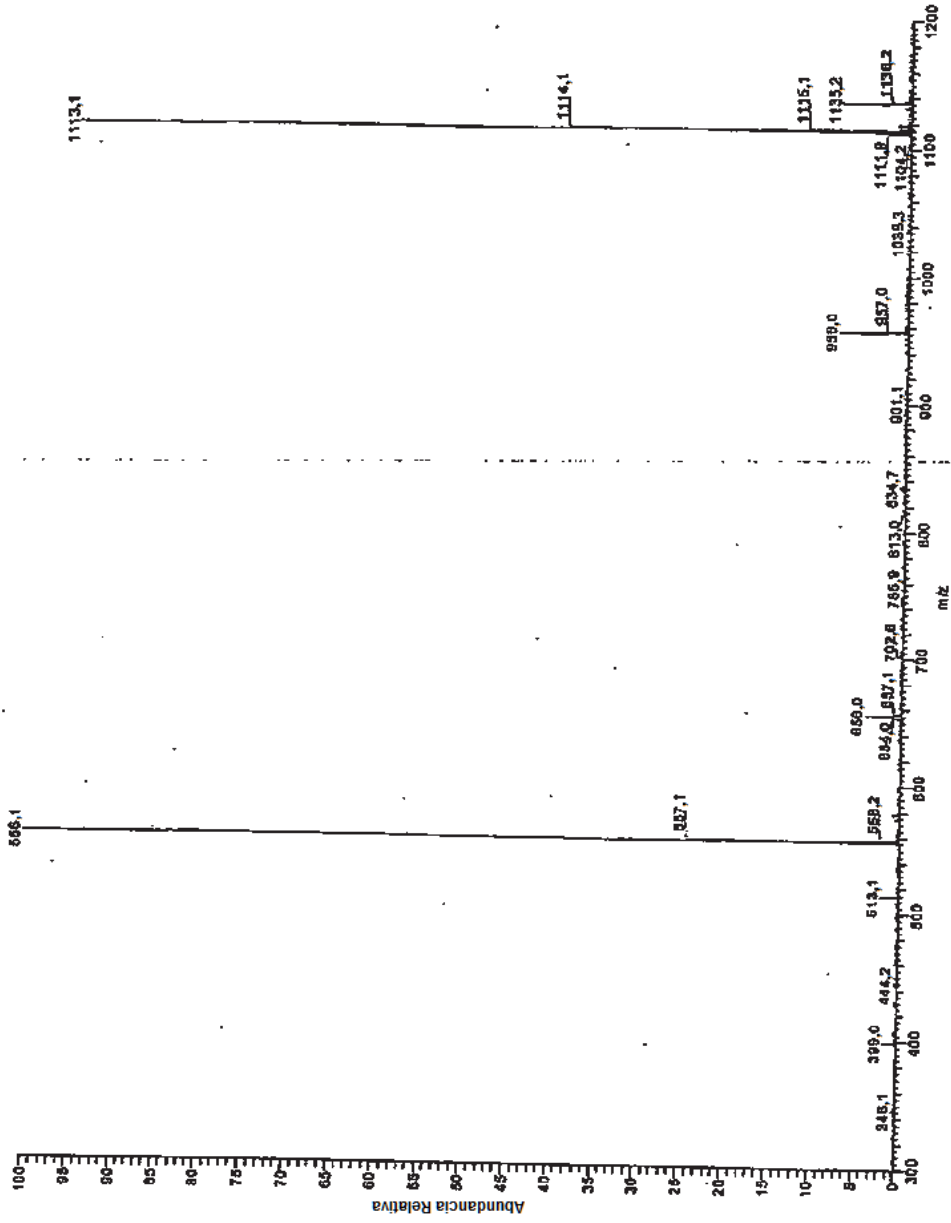


FIGURA 30

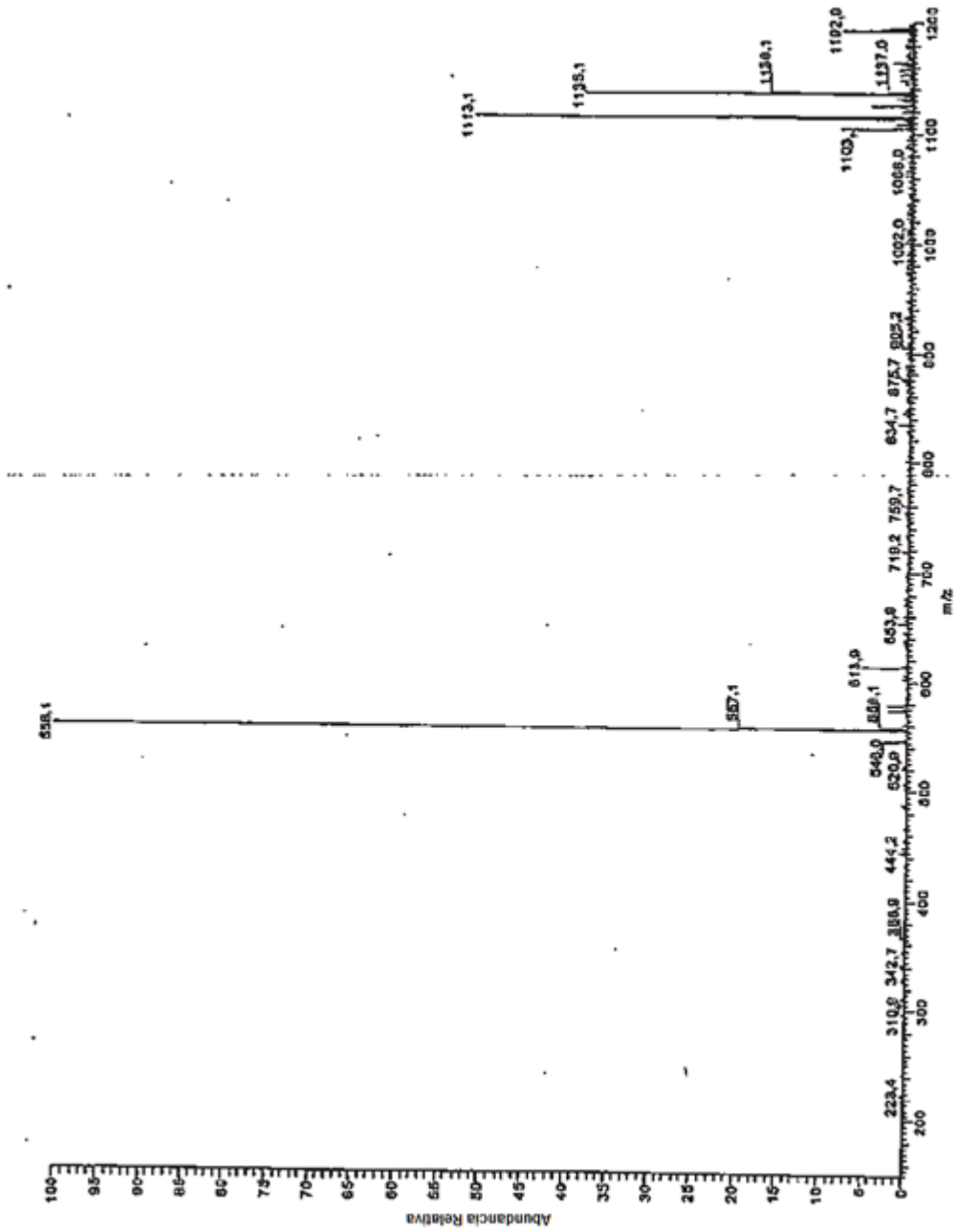


FIGURA 31



FIGURA 32

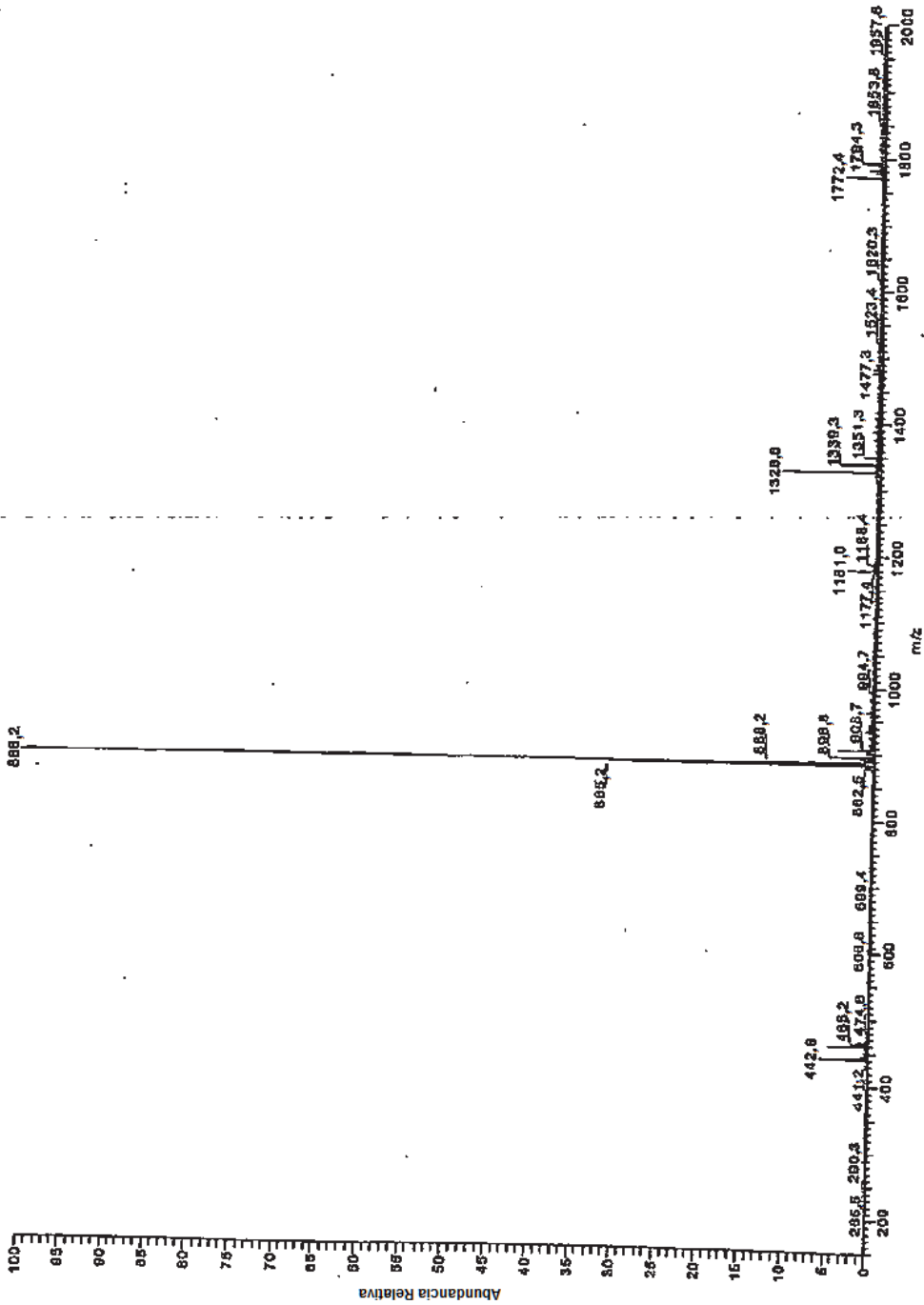


Figura 33



Figura 34

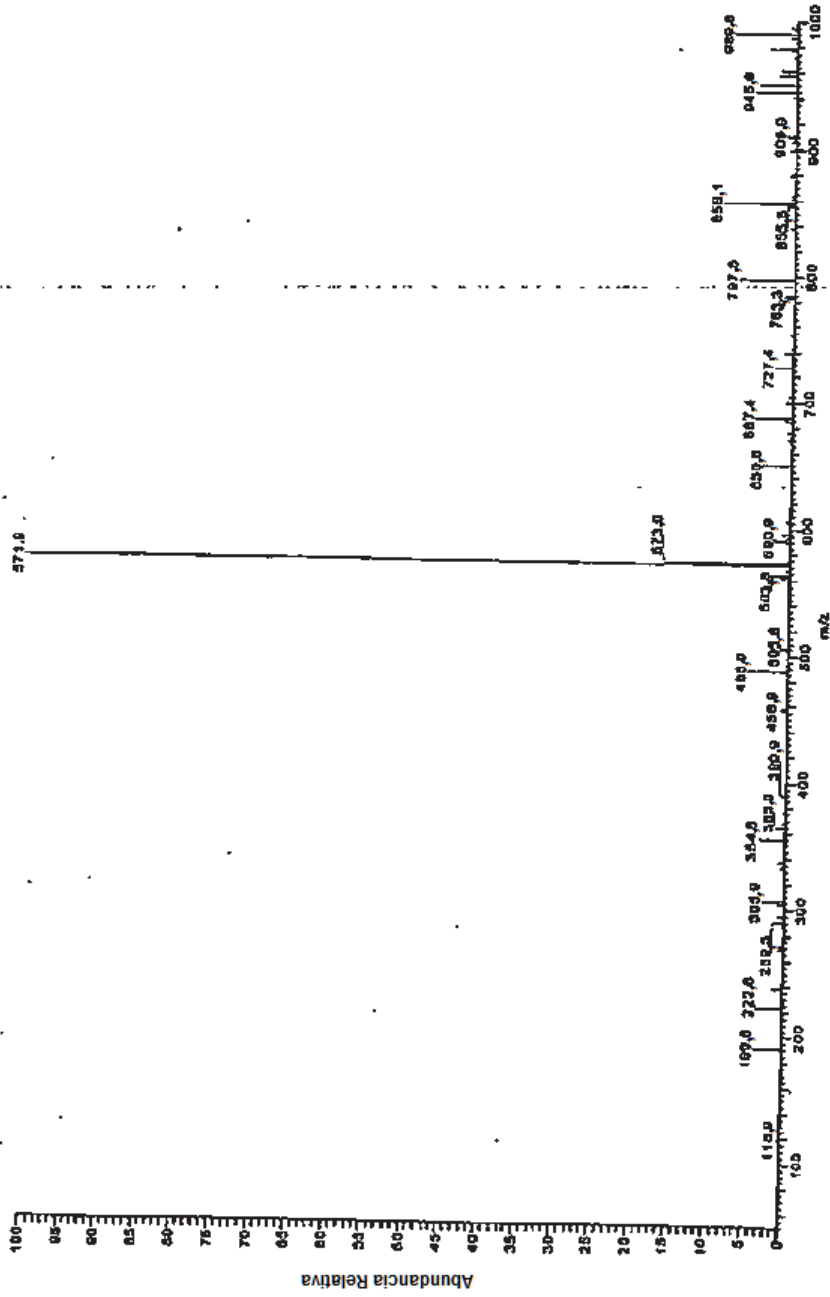


Figura 35

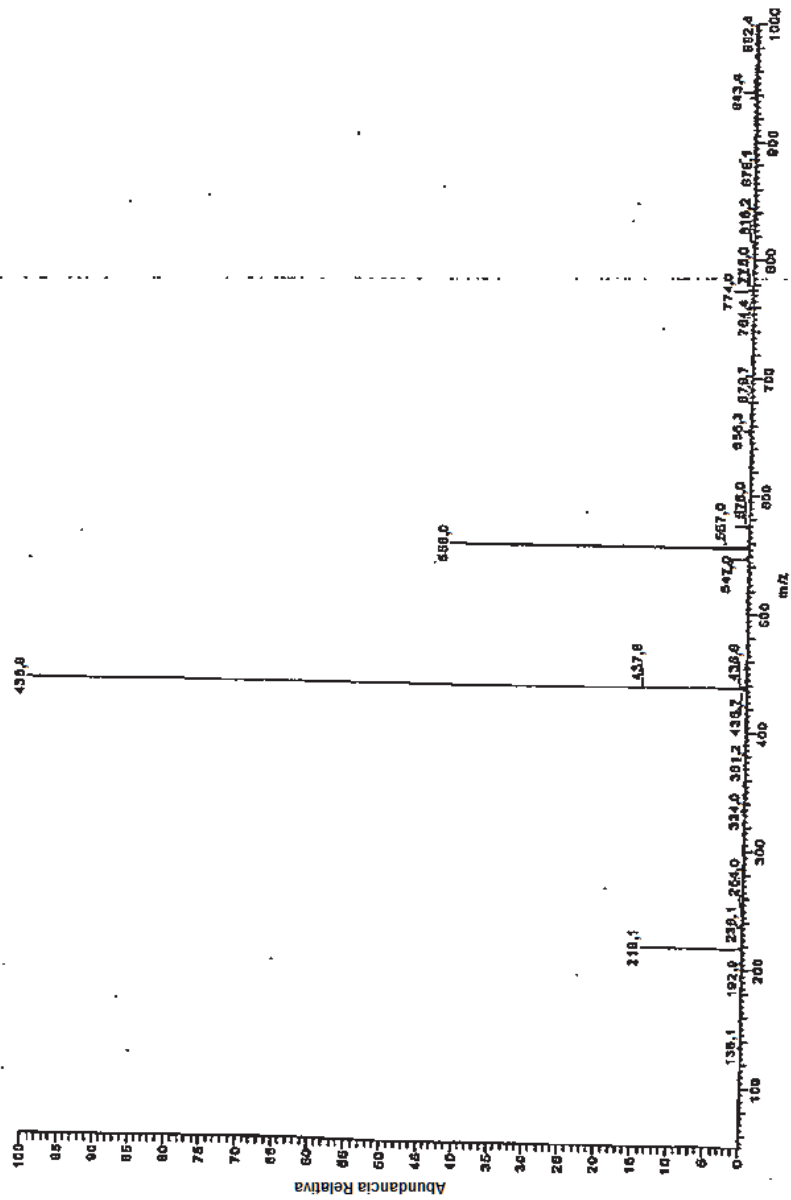


FIGURA 36

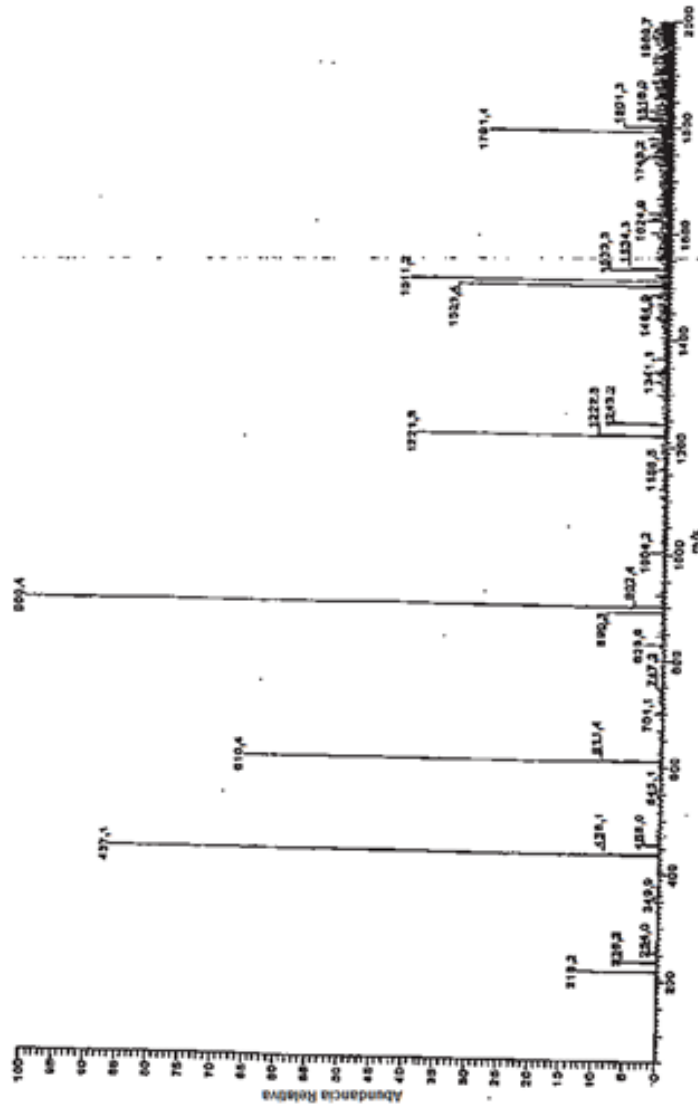


FIGURA 37

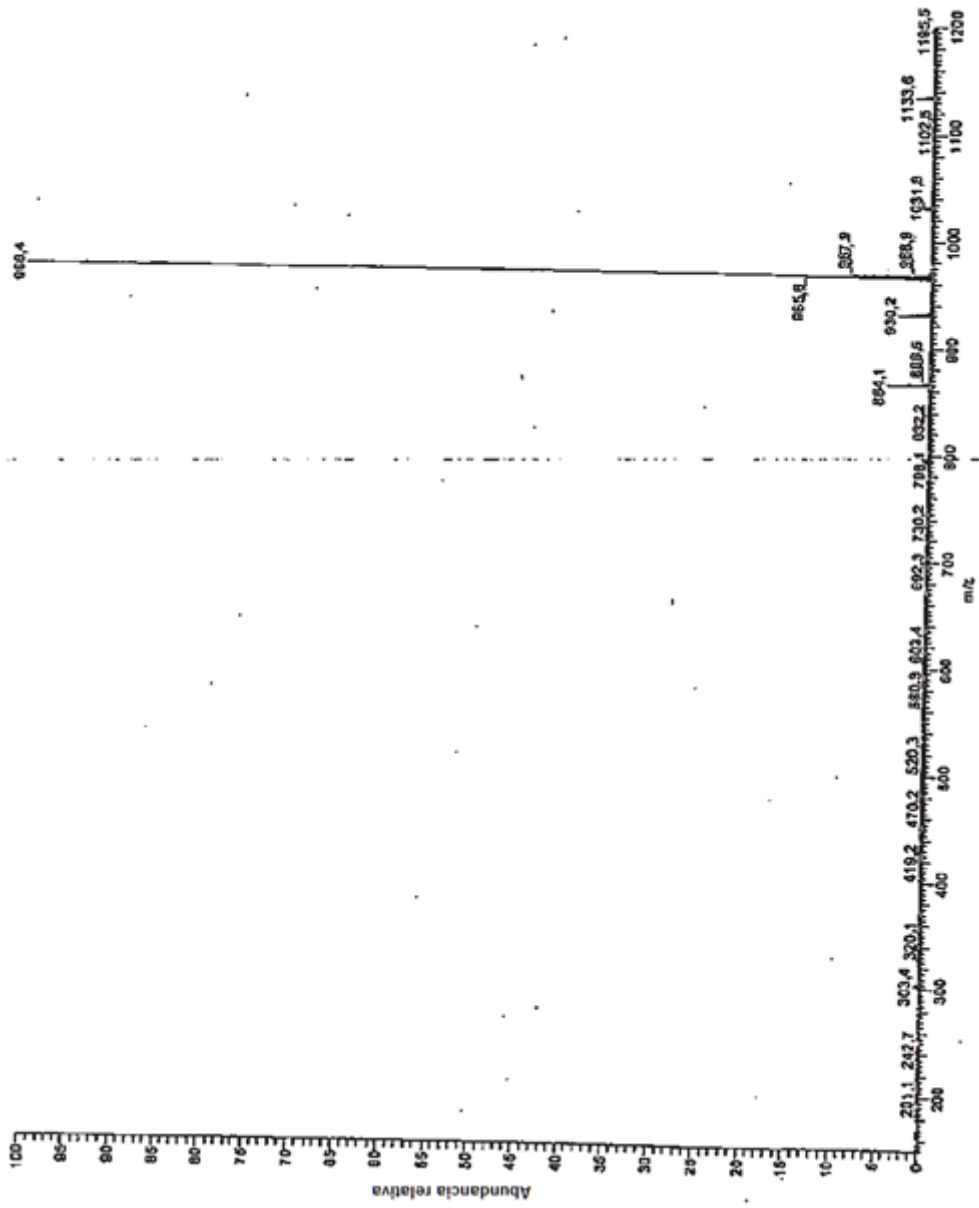


FIGURA 38