

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901871602A1

Publication Date

20120313

Applicant

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Title

OLIGONUCLEOTIDI APTAMERICI GT E LORO USO COME AGENTI
ANTITUMORALI

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

Oligonucleotidi aptamerici GT e loro uso come agenti antitumorali

Campo dell'invenzione

L'invenzione concerne nuovi oligonucleotidi aptamerici di lunghezza 75 nucleotidi (nt) e di sequenza GT in grado di esercitare una specifica e selettiva azione antiproliferativa in cellule tumorali umane e di legare/inattivare le proteine della famiglia del fattore di allungamento eucariotico eEF1A. L'invenzione riguarda inoltre l'uso terapeutico di tali oligonucleotidi come nuovi agenti antitumorali ad attività antiproliferativa in tumori ad elevato grado di aggressività e l'uso diagnostico come reagenti per la rilevazione specifica delle proteine della famiglia eEF1A.

Stato della tecnica

Tra i componenti della famiglia del fattore di allungamento eucariotico eEF1A, due geni sono costitutivamente trascritti: EEF1A1 sul cromosoma 6q14.1 e EEF1A2 sul cromosoma 20q13.3. Le proteine eEF1A appartengono alla superfamiglia delle proteine G; sono tra le proteine più abbondanti nelle cellule dei mammiferi e partecipano al processo di traduzione della proteine, portando l'aminoacil-tRNA (aa-tRNA) sul sito A dei ribosomi sotto forma di complesso ternario eEF1A-GTP-aa-tRNA (Scaggiante B. et al., 2008). Entrambe le proteine eEF1A1 (Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1: NM_001402.5 NP_001393.1) e eEF1A2 (Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2: NM_001958.2 NP_001949.1) hanno anche funzioni non-canoniche: sono coinvolte in molti altri processi cellulari essenziali quali il rimodellamento del citoscheletro e la migrazione cellulare, modulazione dell'attività delle chinasi e della fosforilazione, controllo della fedeltà della traduzione, modulazione della degradazione delle proteine ubiquitinate, risposta delle cellule allo stress e shock termico e attività di modulazione della conformazione delle proteine (Scaggiante B. et al., 2008; Koiwai K et al., 2008; Zhong D et al., 2009; Jeganathan S et al., 2008; Leclercq TM et al., 2008; Panasyuk G et al., 2008).

Nei mammiferi eEF1A1 è espressa in modo ubiquitario, mentre l'espressione di eEF1A2 avviene in tessuti specializzati quali il muscolo scheletrico, cardiaco e nel sistema nervoso centrale (Scaggiante B et al., 2008). Entrambe le proteine

eEF1A1 e eEF1A2 sono implicate nella trasformazione e progressione delle cellule neoplastiche. In particolare, l'espressione del gene EEF1A2 in tessuti diversi dal muscolo scheletrico, cuore e sistema nervoso centrale è associata allo sviluppo di tumori ed è correlata alla loro aggressività in tumori ovarici, della mammella, nel carcinoma del pancreas e nell'epatocarcinoma (Scaggiante B. et al., 2008; Schlaeger C et al., 2008; Cao H et al., 2009; Sun Y et al., 2008; Lee et Surh, 2009). Inoltre, nell'epatocarcinoma l'iperespressione di eEF1A1/2 correla con un aumento del tasso di proliferazione ed eEF1A1/2 sono maggiormente espresse in cellule indifferenziate con fenotipo più aggressivo (Grassi G et al., 2007). Si è dimostrato che eEF1A2 determina la migrazione e l'invasività delle cellule di carcinoma della mammella (Scaggiante B. et al., 2008). Inoltre, sia eEF1A1 che eEF1A2 sono interattori del "gene human testis-specific Y-encoded" (TSPY) ed è stato suggerito che il complesso TSPY-eEF1A1/2 promuova e sostenga la trasformazione neoplastica delle cellule germinali del testicolo, ma anche probabilmente quella delle cellule della prostata o di altri tipi di tessuti somatici (Kido T and Lau YF, 2008). L'iperespressione del gene EEF1A1 è stata associata all'aumento di proliferazione e alla trasformazione delle cellule (Scaggiante B. et al., 2008; Scaggiante B. and Manzini G., 2010). La proteina eEF1A1 regola il tempo di emivita dell'mRNA dell' osteopontina (OPN), fosfoproteina la cui iperespressione è caratteristica di tumori metastatici in stadio avanzato, agendo come fattore transattivante e promuovendo l'invasività di cellule di epatocarcinoma (Zhang J et al., 2009). Un aumento di eEF1A1 è associato alla resistenza di tumori della testa e del collo resistenti al cisplatino. Una isoforma di eEF1A1 è presente nei tumori umani ematopoietici, ma non nelle cellule normali. La deregolazione di eEF1A1 in cellule di roditori esposte a carcinogeni chimici e fisici promuove la trasformazione neoplastica. La diminuzione dell'espressione di eEF1A1 in cellule leucemiche di promielociti sottoposte all'azione del farmaco differenziante "All-trans-retinoic acid" (ATRA) concorre alla sopravvivenza delle cellule maligne. L'iperespressione di eEF1A1 contribuisce alla sopravvivenza di cellule di carcinoma mammario ed è implicata nell'invasività di queste cellule, mentre in cellule murine della linea pro-B conferisce resistenza all'apoptosi in seguito a stress (Scaggiante B et al., 2008; Scaggiante B. and Manzini G., 2010).

L'iperespressione del gene *EEF1A1* è correlato alla resistenza al metotrexate in molti tumori umani solidi e dell'ematopoietico (Selga E et al, 2009). Durante l'alcalinizzazione delle cellule tumorali, fenomeno comune nella trasformazione, un aumento dei livelli di *eEF1A1/2*, mobilizzati dall'actina promuove e sostiene l'invasività delle cellule neoplastiche (Kim J et al, 2009).

Oligodeossiribonucleotidi aptamerici GT fosfodiesterici o parzialmente fosforotioati di lunghezza compresa tra i 20 e 60 nucleotidi si sono dimostrati efficaci nell'inibire in modo specifico, selettivo e dose-dipendente la crescita di cellule tumorali umane (WO 97/20924; Scaggiante B et al., 1998; Morassutti C et al., 1999a; Morassutti C et al., 1999b). Le sequenze oligonucleotidiche GT che funzionano da aptameri sono ligandi delle proteine *eEF1A* con la capacità anche di riconoscere una specifica isoforma prodotta solo dalle cellule tumorali leucemiche (Dapas B. et al., 2003). Questi aptameri GT, in particolare uno di lunghezza 51 nucleotidi, se veicolati da polimeri, sono attivi in concentrazioni nanomolari nell'inibire la proliferazione di cellule tumorali ematopoietiche (Scaggiante B. et al, 2005). È stato dimostrato che gli aptameri GT da 23 a 27 nucleotidi di lunghezza sono attivi come agenti antitumorali se non danno luogo a strutture particolarmente stabili come i quadruplex di G (Scaggiante B et al, 2006). Una sequenza aptamerica GT di lunghezza 27 nucleotidi è in grado di aumentare l'indice terapeutico di farmaci antineoplastici convenzionali in tumori ematopoietici e solidi (Dapas B et al, 2002). Tali oligonucleotidi si sono dimostrati attivi su molti tumori umani solidi ed ematopoietici. Tuttavia, la loro attività non è mai stata studiata in cellule ad elevato grado di malignità quale ad esempio l'epatocarcinoma. In questo tipo di tumore, è stato dimostrato che le proteine della famiglia *eEF1A* sono iperespresse e che contribuiscono alla progressione del tumore (Grassi G et al., 2007).

D'altra parte come noto, l'epatocarcinoma è un tipo di tumore che trova scarse possibilità di interventi farmacologici e pertanto nuove formulazioni utili a controllare la sua espansione/progressione sono estremamente importanti. Altrettanto sentito è il bisogno di trovare molecole e formulazioni di molecole che riescano a controllare in modo efficace la crescita di tumori indifferenziati e quindi la loro disseminazione nell'organismo e che abbiano effetti collaterali limitati o comunque che abbiano un rapporto rischio/beneficio favorevole rispetto alla

Sommario

Pertanto in un primo aspetto l'invenzione ha per oggetto una molecola consistente in un oligonucleotide fosfordiestereo aptamerico avente SEQ ID NO.1 TG(TTTG)₁₈T(TGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGT). Tale sequenza è qui di seguito identificata come GT75.

In un secondo aspetto è oggetto dell'invenzione l'uso terapeutico dell'oligonucleotide aptamerico avente SEQ ID NO.1 TG(TTTG)₁₈T o di suoi derivati come agente antitumorale per il trattamento di patologie tumorali ed in particolare per i tumori ad elevato grado di aggressività e/o indifferenziati. Pertanto, composizioni farmaceutiche che comprendono tale oligonucleotide di

SEQ ID NO.1 o suoi derivati per il trattamento di tumori ad elevata aggressività e/o indifferenziati sono un ulteriore oggetto dell'invenzione.

In un altro aspetto l'invenzione ha per oggetto l'uso diagnostico dell'oligonucleotide aptamerico avente SEQ ID NO.1 TG(TTTG)₁₈T o di suoi derivati come reagenti per kit diagnostici per il rilevamento di proteine della famiglia eEF1A per la diagnosi/prognosi di patologie tumorali ad elevata aggressività e per il monitoraggio dell'efficacia del trattamento chemioterapico scelto.

In un ulteriore aspetto quindi l'invenzione ha per oggetto il kit diagnostico comprendente l'oligonucleotide aptamerico di SEQ ID NO.1 TG(TTTG)₁₈T o suoi derivati per la diagnosi e/o prognosi di patologie tumorali e per il monitoraggio dell'efficacia del trattamento terapeutico.

Breve descrizione delle figure

Figura 1. Effetto dose-risposta di GT75 sulla crescita cellulare misurata con il test del MTT come assorbanza della linea U2SO dopo 10 giorni di coltura in confronto con l'oligonucleotide CT75.

Figura 2. Effetto dose-risposta di GT75 sulla crescita cellulare misurata con il test del MTT come assorbanza della linea MO59J dopo 10 giorni di coltura in confronto con l'oligonucleotide CT75.

Figura 3. Effetto dose-risposta di GT75 sulla crescita cellulare misurata con il test del MTT come assorbanza delle linee LNCaP, DU-145 e PC-3 dopo 10 giorni di coltura in confronto con l'oligonucleotide CT75.

Figura 4. Effetto della idarubicina a diverse dosi dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 5. Effetto del bortezomib (velcade) a diverse dosi dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 6. Effetto della associazione tra GT75 e idarubicina (schema trattamento in somministrazione unica 1: trasfezione con oligonucleotidi giorno 1, incubazione con farmaco giorno 2) alle dosi indicate di idarubicina dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 trattate con GT75 o CT75 o non trattate NT e misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 7. Effetto della associazione tra GT75 e velcade (schema trattamento in

somministrazione unica 1 come in precedenza) alle dosi indicate di velcade dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 trattate con GT75 o CT75 o non trattate NT e misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 8. Effetto della associazione tra GT75 e idarubicina (schema trattamento in somministrazione unica 2: trasfezione con oligonucleotidi giorno 1, incubazione con farmaco giorno 3) alle dosi indicate di idarubicina dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 trattate con GT75 o CT75 o non trattate NT e misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 9. Effetto della associazione tra GT75 e velcade (schema trattamento in somministrazione unica 2 come in precedenza) alle dosi indicate di velcade dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 trattate con GT75 o CT75 o non trattate NT e misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 10. Effetto della associazione tra GT75 e idarubicina (schema trattamento in somministrazione unica 3: trasfezione con oligonucleotidi giorno 1, incubazione con farmaco giorno 4) alle dosi indicate di idarubicina dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 trattate con GT75 o CT75 o non trattate NT e misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 11. Effetto della associazione tra GT75 e velcade (schema trattamento in somministrazione unica 3 come in precedenza) alle dosi indicate di velcade dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 trattate con GT75 o CT75 o non trattate NT e misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 12. Effetto della associazione tra GT75 e idarubicina (schema trattamento in somministrazione unica 4: trasfezione con oligonucleotidi giorno 1, incubazione con farmaco giorno 8) alle dosi indicate di idarubicina dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 trattate con GT75 o CT75 o non trattate NT e misurata con il test del MTT come assorbanza.

Figura 13. Effetto della associazione tra GT75 e velcade (schema trattamento in somministrazione unica 4 come in precedenza) alle dosi indicate di velcade dopo 10 giorni di coltura di cellule di epatocarcinoma JHH6 trattate con GT75 o CT75 o non trattate NT e misurata con il test del MTT come assorbanza.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

L'invenzione concerne un oligonucleotide aptamerico avente la SEQ ID NO.1

Allo scopo di verificare se la lunghezza dell'oligonucleotide, insieme con la sequenza, fosse il fattore determinante per l'attività antiproliferativa e per la specificità su cellule tumorali altamente aggressive ed indifferenziate, l'oligonucleotide GT75 è stato confrontato con oligonucleotidi GT di sequenza analoga ma di lunghezza inferiore, ovvero oligonucleotidi di SEQ ID NO. 2 TG(TTTG)₆T (di seguito indicato come GT27) e SEQ ID NO. 3 TG(TTTG)₁₂T (di seguito indicato come GT51) e con oligonucleotidi di sequenza CT e stessa sequenza e lunghezza di SEQ ID NO. 4 TC(TTTC)₁₈T (di seguito indicato come CT75) o di lunghezza inferiore di SEQ ID NO. 5 TC(TTTC)₆T (di seguito indicato come CT27) e SEQ ID NO. 6 TC(TTTC)₁₂T (di seguito indicato come CT51).

GT75 (SEQ ID NO. 1)

GT27 (SEQ ID NO. 2)

GT51 (SEQ ID NO. 3)

CT75 (SEQ ID NO. 4)

TCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT

CT27 (SEQ ID NO. 5)

CT51 (SEQ ID NO. 6)

Dal confronto è emerso che il GT75 ha dimostrato la capacità inibire la proliferazione di cellule di epatocarcinoma umano indifferenziato in modo sorprendente specifico e dose-dipendente dopo un'unica somministrazione di dosi nanomolari. Al contrario, oligonucleotidi GT di lunghezza inferiore a 75 nt, ed in particolare GT27 e GT51, non hanno dimostrato alcuna significativa attività di inibizione della crescita delle cellule di epatocarcinoma indifferenziato. Il GT75 si è dimostrato attivo anche su altre linee di tumori umani solidi che non trovano efficace trattamento terapeutico come l'osteosarcoma e il glioblastoma. In un modello di cellule di adenocarcinoma della prostata a diverso grado di aggressività, il GT75 si è dimostrato molto attivo in quelle più indifferenziate, avvalorando il risultato della sua sorprendente azione antiproliferativa su tumori umani ad elevata aggressività.

Inoltre, il GT75 si è dimostrato anche in grado di aumentare notevolmente l'indice terapeutico di convenzionali antineoplastici con il risultato di inibire la crescita dell'epatocarcinoma a dosi sub-tossiche e con diversi schemi di formulazione delle molecole attive. Questo effetto di potenziamento è particolarmente interessante, perché consente di usare il GT75 in azione combinata con farmaci antineoplastici convenzionali a dosi che minimizzano il rischio di effetti collaterali in molteplici tipi di patologie tumorali per le quali il farmaco antineoplastico convenzionale è considerato terapia di elezione.

La presente invenzione concerne quindi anche un metodo terapeutico

comprendente la somministrazione ad un paziente affetto da patologie tumorali altamente aggressive e/ indifferenziate, dell'oligonucleotide aptamerico di SEQ ID NO. 1 e suoi derivati secondo l'invenzione, con somministrazione singola o in combinazione con altri farmaci antineoplastici degli stessi.

Pertanto la presente invenzione si estende a composizioni farmaceutiche in cui i principi attivi secondo l'invenzione sono combinanti con opportuni eccipienti e/o diluenti o con altri principi attivi per somministrazione sistemica o locale. I principi attivi secondo l'invenzione sono inoltre preferibilmente veicolati mediante sistemi di *drug-delivery* ad esempio liposomi, nanoparticelle lipidiche e/o sistemi di *bio-delivery* e/o sistemi di "*targeting*" molecolare mediata da sequenze proteiche (ad esempio "RGD" *domains*) nel loro sito di azione ovverossia il tumore sia esso primario o secondario.

Inoltre, data la capacità degli aptameri di riconoscere le proteine della famiglia eEF1A ulteriore utilizzo di GT75 appare nel settore diagnostico mediante l'uso di oligomeri di questo tipo marcati con sostanze fluorescenti o coloranti per esami di tipo istologico o per Aptamer DNA-based assays.

Il metodo diagnostico può anche essere di tipo prognostico per la valutazione della progressione del tumore. Infatti, se dall'esame istologico risulta iperespressione delle proteine eEF1A questo può essere correlato a prognosi fausta/infausta insieme agli scores già accreditati ed in uso per la tipizzazione degli stadi tumorali. Per gli scopi diagnostici in particolare, l'oligonucleotide aptamerico GT75, coniugato un sistema di rilevamento fluorocromico o colorimetrico, può essere ancorato ad un supporto dove proteine estratte da campioni biotici vengono messe a contatto con l'aptamero GT 75 o un suo derivato in una soluzione ad elevata stringenza che garantisce la specificità della reazione. Se le proteine specifiche sono presenti, esse si legano all'aptamero e vengono misurate tramite l'apposito segnale di rilevamento dell'avvenuto legame. In alternativa l'aptamero coniugato con un fluoroforo o con un cromoforo può essere usato come anticorpo (aptabody) su campioni istologici paraffinati o su campioni istologici a fresco per analisi istochimiche ai fini diagnostici e prognostici. Ulteriormente, l'aptamero opportunamente coniugato alle due estremità con un fluoroforo e un quencher può

essere usato per quantificare in modo molto preciso le proteine eEF1A presenti in un campione tumorale per mezzo di tecniche come la FRET.

Tipicamente il metodo diagnostico può comprendere almeno le fasi di:

- a. fornire un campione biologico da biopsia;
- b. porre in contatto il campione biologico con l'oligonucleotide di SEQ ID NO. 1 o un suo derivato, opzionalmente marcato;
- c. rilevare la reazione tra l'oligonucleotide di SEQ ID NO. 1 o un suo derivato e le proteine della famiglia eEF1A presenti nel campione biologico;
- d. misurare il segnale di il rilevamento dell'avvenuta reazione.

Il kit diagnostico per la determinazione dell'espressione delle proteine eEF1A mediante l'uso dell'oligonucleotide aptamerico GT75 o un suo derivato può comprendere almeno: un contenitore contenente l'oligonucleotide aptamerico GT75 di SEQ ID NO.1 o un suo derivato, opzionalmente marcato (preferibilmente con fluorofori e/o cromofori), un contenitore un campione delle proteine eEF1A da usare come ligandi competitivi, opzionalmente marcato, ed un foglietto illustrativo con le istruzioni.

Seguono ora alcuni esempi di realizzazione dell'invenzione e di valutazione dei benefici derivanti dall'oligonucleotide aptamerico GT75 dell'invenzione, forniti a titolo esemplificativo e non limitativo dell'invenzione stessa.

ESEMPI

Esempio 1: sintesi degli oligonucleotidi (GT)_n e (CT)_n (n= 75, 51, 27)

Le sequenze deossiribonucleotidiche degli oligonucleotidi fosfordiesterei GT75 e CT75 sono state sintetizzate con il metodo chimico noto delle fosforamiditi (Mag M and Engels, 1988) e acquistate dalla ditta Eurofins MWG/operon. Gli oligonucleotidi prima dell'uso su cellule sono stati deprotetti, desalificati e purificati da tutti i prodotti tossici mediante HPSF e la loro purezza controllata con la MALDI-TOF MS.

Gli oligonucleotidi così preparati sono stati saggiati su diverse linee cellulari umane: epatocarcinoma umano indifferenziato, adenocarcinoma della prostata androgeno-dipendente, adenocarcinoma della prostata androgeno-indipendente, osteosarcoma e glioblastoma secondo le metodiche sperimentali di seguito

riportate.

Metodi di coltivazione delle linee cellulari e somministrazione degli oligonucleotidi

Tutte le linee cellulari umane sono state coltivate in terreno completo contenente 10% FBS e supplementato con 10 U/ml penicillina, 10 µg/ml streptomina e 2 mM L-glutamina. I terreni, supplementi e FBS sono stati acquistati da Invitrogen.

Le linee cellulari usate e i rispettivi terreni sono di seguito indicati:

- JHH6 epatocarcinoma indifferenziato, RPMI medium;
- LNCaP adenocarcinoma della prostata androgeno-dipendente e DU-145 e PC-3 adenocarcinoma della prostata androgeno indipendente (aggressività delle cellule tumorali : PC-3>DU-145>LNCaP), RPMI medium;
- U2OS osteosarcoma, DMEM medium;
- MO59J glioblastoma, DMEM medium.

Le cellule, se non indicato diversamente, sono state seminate alle seguenti densità in 200 µl dell'appropriato terreno completo in 96 microtiter wells:

- le cellule delle linee JHH6, DU-145, PC-3, U2OS alla densità di 10^3 ;
- le cellule delle linea MO59J alla densità di 2.5×10^3 ;
- le cellule delle linea LNCaP alla densità di 4×10^3 .

Dopo 12 h di incubazione a 37°C, 5% CO₂ per permetterne l'adesione, le cellule sono state trasfettate con gli oligonucleotidi sintetizzati come descritto all'esempio 1. Gli oligonucleotidi sono stati somministrati alle concentrazioni indicate negli esempi riportati di seguito, usando il metodo della trasfezione con liposomi cationici ed in particolare con la Lipofectamina come descritto da Yu JY et al., 2002. La Lipofectamin 2000 (Invitrogen) è stata idratata in 100 µl di Optimem (Invitrogen), poi mescolata in rapporto 1:1 (p/p) con gli oligonucleotidi e la miscela è stata incubata per 20 min a temperatura ambiente. La miscela liposoma/oligonucleotide è stata poi diluita con optimem per ottenere la concentrazione desiderata di oligonucleotidi/100 µl di terreno. 100 µl di terreno contenente gli oligonucleotidi e il trasfettante sono stati aggiunti alle cellule seminate in 96 well microtiter in sostituzione del loro terreno completo. Dopo 3 ore di incubazione a 37°C, il terreno con gli oligonucleotidi e trasfettante è stato sostituito con 200 µl di terreno completo fresco. Il terreno delle cellule è stato

sostituito con terreno fresco ogni 72 h di coltura per i primi due intervalli e successivamente dopo 48 h, con il seguente schema:

- giorno 0 semina;
- 1° giorno trasfezione e cambio terreno dopo 3 h;
- 4° giorno cambio terreno;
- 7° giorno cambio terreno;
- 9°giorno cambio terreno.

La crescita cellulare è stata monitorata con il test di MTT (Scudiero DA et al., 1988) nei tempi indicati (3° giorno, 6° giorno e 10° giorno dalla somministrazione dell'oligonucleotide). Alle cellule sono stati aggiunti 20 µl of MTT (4 mg/ml) per ogni pozzetto. Le cellule sono state incubate per 4 ore a 37°C e 5% CO₂, poi il mezzo è stato rimosso e le cellule solubilizzate in 200 µl di DMSO. Lo sviluppo del colore dei sali di tetrazolio è stato letto a 540-690 nm in un microtiter plate reader.

Esempio 2: effetto sull'attività antiproliferativa in cellule di epatocarcinoma umano indifferenziato JHH6 – confronto tra (GT)_n e (CT)_n (n= 75, 51, 27)

Il paragone tra GT75 e sequenze GT di lunghezza inferiore è stato eseguito su cellule di epatocarcinoma umano indifferenziato JHH6 secondo le metodiche di coltivazione delle colture cellulari e di somministrazione degli oligomeri prima descritte, misurando l'effetto in diverse condizioni di concentrazione degli oligomeri, densità cellulare e tempi di osservazione dalla somministrazione degli oligomeri.

In un primo saggio è stata valutata la crescita cellulare misura con il test di MTT ad un'unica somministrazione di 250nM di oligomeri su $2,5 \times 10^3$ cellule in 6 well microtiter dopo 3 e 6 giorni dalla coltura. Le sequenze aptameriche GT di lunghezza inferiore a 75-mer (27-mer e 51-mer) sono paragonate rispetto al GT75 come medie \pm sd dell'assorbanza e come % della crescita cellulare rispetto alle sequenze di controllo CT75, CT51 e CT27 o ai campioni non trattati (NTC). La crescita cellulare è stata valutata con il test di MTT come in precedenza indicato e pertanto le misure effettuate sono misure di assorbanza.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1 qui di seguito.

Tabella 1. Effetto comparativo di un'unica dose di 250nM di oligonucleotidi a 3 e 6 giorni dalla trasfezione su $2,5 \times 10^3$ cellule di JHH6

giorno	GT27	CT27	GT51	CT51	GT75	CT75	NTC
3°	0,518	0,540	0,202	0,212	0,035	0,212	0,895
<i>s.d.</i>	±0,05	±0,02	±0,06	±0,07	±0,03	±0,09	±0,08
%CT	95	-	95	-	16	-	
%NTC	58	60	22	24	4	24	
6°	0,787	0,839	1,203	1,029	0,688	1,122	1,122
<i>s.d.</i>	±0,12	±0,09	±0,09	±0,05	±0,06	±0,09	±0,09
%CT	94	-	117	-	61	-	
%NTC	47	51	73	62	41	68	

Come si può vedere dalla tabella, solo GT75 è in grado di esercitare una significativa attività di inibizione della proliferazione delle cellule tumorali JHH6. Inoltre, va notato che l'inibizione della crescita deriva da un effetto biologico specifico, come si può dedurre dal paragone con la sequenza di controllo CT75. Va anche notato che nel controllo CT75 la minor proliferazione cellulare deriva dalla aspecifica tossicità dovuta al trattamento di trasfezione.

In un secondo test è stata invece misurata la vitalità cellulare alla dose di 125 nM su cellule con una densità di 10^3 in 96 well microtiter e con osservazione a 3, 6 e 10 giorni dalla trasfezione.

Nella tabella 2 sono riportati i dati, misurati come assorbanza, di comparazione ottenuti tra GT75 e sequenze GT più corte e le relative sequenze CT di controllo. Si noti come solo GT75 dimostra a 10 giorni dall'inizio di un'unica somministrazione un significativo effetto antiproliferativo rispetto al controllo CT75.

Tabella 2. Effetto comparativo alla dose unica di 125nM di oligonucleotidi a 3, 6 e 10 giorni dalla trasfezione su 10^3 cellule di JHH6

giorno	GT27	CT27	GT51	CT51	GT75	CT75	NTC
3°	0,559	0,424	0,285	0,267	0,150	0,236	0,915
<i>s.d.</i>	±0,048	±0,014	±0,028	±0,037	±0,026	±0,024	±0,067
%CT	132	-	107	-	63	-	
%NTC	61	46	31	29	16	26	
6°	1,41	1,61	0,74	0,77	0,033	0,42	2,03
<i>s.d.</i>	±0,124	±0,189	±0,118	±0,316	±0,025	±0,062	±0,183
%CT	87	-	96	-	7,8	-	

%NTC	69	79	36	38	1,6	21	
10°	2,473	2,242	2,216	2,045	0,441	1,643	2,055
s.d.	±0,199	±0,127	±0,125	±0,067	±0,144	±0,189	±0,022
%CT	110	-	108	-	27	-	
%NTC	120	109	108	99	21	80	

Esempio 3: effetto sull'attività antiproliferativa in cellule di epatocarcinoma umano indifferenziato JHH6 alla densità di 10^3 cellule a diverse dosi di oligonucleotidi $(GT)_n$ e $(CT)_n$ ($n = 75, 51, 27$)

Il saggio di confronto è stato effettuato come nell'esempio 2, usando in questo caso la densità cellulare di 10^3 e dosi scalari di oligonucleotidi 125, 250 e 500nM. Nelle tabelle 3-5 sono illustrati gli effetti dose-risposta comparativi tra GT75 e GT di lunghezza inferiore sulle JHH6 seminate alla densità di 10^3 cellule in 96 well microtiter e monitorati a tempi diversi dall'unica somministrazione rispetto agli oligomeri di controllo CT e ai campioni non trattati (NTC). Le determinazioni sono anche in questo caso di assorbanza.

Tabella 3. Effetto comparativo alla dose di 125nM di oligonucleotidi a 3, 6 e 10 giorni dalla trasfezione su 10^3 cellule di JHH6

giorno	GT27	CT27	GT51	CT51	GT75	CT75	NTC
3°	0,48	0,43	0,166	0,159	0,006	0,084	0,86
s.d.	±0,04	±0,015	±0,08	±0,02	±0,01	±0,03	±0,07
%CT	111	-	104	-	0,07	-	
%NTC	56	50	19	18	0,7	9,8	
6°	1,36	1,28	0,674	0,596	0,018	0,292	2,02
s.d.	±0,12	±0,14	±0,12	±0,08	±0,01	±0,06	±0,11
%CT	106	-	113	-	6	-	
%NTC	67	63	33	29	0,9	14	
10°	2,48	2,45	2,29	2,36	0,162	1,987	2,52
s.d.	±0,03	±0,21	±0,11	±0,07	±0,03	±0,05	±0,10
%CT	101	-	97	-	8,1	-	
%NTC	98	97	91	94	6,4	79	

Tabella 4. Effetto comparativo alla dose di 250nM di oligonucleotidi a 3, 6 e 10 giorni dalla trasfezione su 10^3 cellule di JHH6

giorno	GT27	CT27	GT51	CT51	GT75	CT75	NTC
3°	0,153	0,145	0,021	0,019	-0,006	0,01	0,86
<i>s.d.</i>	±0,03	±0,03	±0,01	±0,01	±0,01	±0,005	±0,07
%CT	105	-	110	-	-0,5	-	
%NTC	18	17	2,4	2,2	-0,7	1,5	
6°	0,696	0,659	0,1	0,14	-0,001	0,06	2,02
<i>s.d.</i>	±0,06	±0,07	±0,003	±0,009	±0,01	±0,03	±0,11
%CT	106	-	71	-	-0,2	-	
%NTC	34	33	5	7	-0,05	3	
10°	2,35	2,17	0,743	0,789	0,05	0,581	2,52
<i>s.d.</i>	±0,13	±0,14	±0,15	±0,29	±0,06	±0,28	±0,10
%CT	108	-	94	-	8,6	-	
%NTC	93	86	29	31	2	23	

Tabella 5. Effetto comparativo alla dose di 500nM di oligonucleotidi a 3, 6 e 10 giorni dalla trasfezione su 10^3 cellule di JHH6

	GT27	CT27	GT51	CT51	GT75	CT75	NTC
3°	0,06	0,08	0,01	0,01	-0,01	0,016	0,86
<i>s.d.</i>	±0,004	±0,03	±0,01	±0,003	±0,005	±0,02	±0,07
%CT	75	-	100	-	-62	-	
%NTC	7	9	1	1	1	2	
6°	0,35	0,33	0,09	0,11	-0,01	0,01	2,02
<i>s.d.</i>	±0,004	±0,05	±0,08	±0,03	±0,007	±0,007	±0,11
%CT	106	-	82	-	-1	-	
%NTC	17	16	4	5	-0,5	0,5	
10°	1,51	1,36	0,34	0,32	0,01	0,298	2,52
<i>s.d.</i>	±0,26	±0,34	±0,19	±0,17	±0,004	±0,13	±0,10
%CT	111	-	106	-	3	-	
%NTC	60	54	13	13	0,4	12	

Si può notare come solo GT75 sia in grado di esercitare uno specifico effetto dose-dipendente di inibizione sulla crescita delle JHH6.

Esempio 4: studio dell'effetto antiproliferativo di GT75 e CT75 in altre linee cellulari tumorali

L'attività antiproliferativa di GT75 è stata monitorata dopo 10 giorni di coltura delle cellule. Inoltre, per ogni linea tumorale è stata valutata l'efficienza di trasfezione e solo le linee con incorporazione di almeno il 90% degli oligomeri sono state considerate.

Come illustrato in figura 1, GT75 esercita un significativo e specifico effetto antiproliferativo dose-dipendente su una linea di osteosarcoma, rispetto al controllo CT75.

In figura 2 è illustrato l'effetto dose-risposta di GT75 su una linea di glioblastoma. Si noti l'effetto antiproliferativo specifico a partire dalla dose 125 nM.

In figura 3 è illustrato l'effetto antiproliferativo di un panel di linee tumorali di prostata a diverso grado di aggressività (PC-3>DU-145>LNCaP). Si noti come GT75 esercita un effetto antiproliferativo significativo e specifico solo nella linea di adenocarcinoma della prostata a maggior aggressività.

Questi risultati indicano che GT75 è particolarmente attivo in linee tumorali umane indifferenziate e con indice di aggressività maggiore che sono ormone-indipendenti (PC-3).

Esempio 5: effetto di GT75 e CT75 in associazione con antineoplastici convenzionali in cellule di epatocarcinoma

L'effetto antiproliferativo della combinazione tra GT75 e due farmaci antineoplastici convenzionali (idarubicina e bortezomib) è stata studiata nella linea indifferenziata di epatocarcinoma JHH6. L'idarubicina è un'antraciclina il cui meccanismo di azione si esplica, come la daunomicina da cui deriva, intercalandosi al DNA ed inibendone la trascrizione. Il bortezomib (velcade) è invece un derivato dipeptidilico dell'acido boronico che agisce inibendo l'attività del proteosoma 26S che degrada le proteine ubiquitinate. L'effetto conseguente è l'inibizione di tutta una cascata di eventi molecolari che portano alla morte cellulare. Il GT75 e gli antineoplastici di uso clinico sono stati somministrati secondo diversi schemi terapeutici in dosi sub-tossiche che da sole non alterano

significativamente la crescita delle cellule per verificare se il trattamento combinato è in grado di dare attività antiproliferativa sulla crescita delle cellule.

L'effetto di diverse dosi dei due farmaci convenzionali è stata studiata sulla crescita di 10^3 JHH6 coltivate in 96 well microtiter secondo i seguenti schemi terapeutici:

- schema trattamento in somministrazione unica 1: trasfezione con oligonucleotidi giorno 1, incubazione con farmaco giorno 2;
- schema trattamento in somministrazione unica 2: trasfezione con oligonucleotidi giorno 1, incubazione con farmaco giorno 3;
- schema trattamento in somministrazione unica 3: trasfezione con oligonucleotidi giorno 1, incubazione con farmaco giorno 4;
- schema trattamento in somministrazione unica 4: trasfezione con oligonucleotidi giorno 1, incubazione con farmaco giorno 8.

Come si può notare dalle figure 4 e 5, l'idarubicina non altera in modo significativo la crescita delle cellule misurata con il test MTT fino a 5 ng/ml, mentre il velcade fino ad almeno 15 nM.

Come dose sub tossica standard di GT75 è stata scelta quella di 125 nM, che, in queste condizioni sperimentali, non dà più del 20% di inibizione della crescita delle cellule. Le dosi sub tossiche dell'idarubicina e del velcade e quella del GT75 sono perciò usate per studiare l'effetto del trattamento combinato, in quanto queste da sole non sono in grado di produrre un significativo effetto antiproliferativo.

Per la specificità dell'azione del GT75 gli esperimenti sono stati condotti in parallelo anche con la sequenza di controllo CT75. La crescita delle cellule è stata monitorata con il test MTT dopo 10 giorni di coltura.

In figura 6 sono illustrati gli effetti della combinazione tra GT75 e di diverse dosi sub tossiche di idarubicina fino a 5 ng/ml, mentre in figura 7 quello tra GT75 e dosi sub tossiche di velcade fino a 15 nM con lo schema di trattamento 1.

In figura 8 sono illustrati gli effetti della combinazione tra GT75 e di diverse dosi sub tossiche di idarubicina fino a 5 ng /ml, mentre in figura 9 quello tra GT75 e dosi sub tossiche di velcade fino a 15 nM con lo schema di trattamento 2.

In figura 10 sono illustrati gli effetti della combinazione tra GT75 e di diverse dosi sub tossiche di idarubicina fino a 5 ng/ml, mentre in figura 11 quello tra GT75 e

dosi sub tossiche di velcade fino a 15 nM con lo schema di trattamento 3.

In figura 12 sono illustrati gli effetti della combinazione tra GT75 e di diverse dosi sub tossiche di idarubicina fino a 5 ng/ml, mentre in figura 13 quello tra GT75 e dosi sub tossiche di velcade fino a 15 nM con lo schema di trattamento 4.

Dai risultati ottenuti si può concludere che GT75 è in grado di aumentare in modo significativo e specifico l'indice terapeutico dei due farmaci in tutte le diverse formulazioni indicate.

Riferimenti bibliografici

Cao H, Zhu Q, Huang J, Li B, Zhang S, Yao W, Zhang Y. Regulation and functional role of eEF1A2 in pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* **2009** Feb;27;380(1):11-6.

Dapas B, Tell G, Scaloni A, Pines A, Ferrara L, Quadrifoglio F, Scaggiante B. Identification of different isoforms of eEF1A in the nuclear fraction of human T-lymphoblastic cancer cell line specifically binding to aptameric cytotoxic GT oligomers. *Eur J Biochem.* **2003** Aug;270(15):3251-62.

Dapas B, Perissin L, Pucillo C, Quadrifoglio F, Scaggiante B. Increase in therapeutic index of doxorubicin and vinblastine by aptameric oligonucleotide in human T lymphoblastic drug-sensitive and multidrug-resistant cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002** Aug;12(4):247-55.

Grassi G, Scaggiante B, Farra R, Dapas B, Agostini F, Baiz D, Rosso N, Tiribelli C. The expression levels of the translational factors eEF1A 1/2 correlate with cell growth but not apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines with different differentiation grade. *Biochimie.* **2007** Dec;89(12):1544-52.

Grassi M, Cavallaro G, Scirè S, Scaggiante B., Dapas B, Farra R, Baiz D, Giansante C, Guarnieri G, Perin D, Grassi G. Current strategies to improve the efficacy and the delivery of nucleic acid based drugs. *Current Signal Transduction Therapy.* **2010**; 5(2) 92-120.

Jeganathan S, Morrow A, Amiri A, Lee JM. Eukaryotic elongation factor 1A2 cooperates with phosphatidylinositol-4 kinase III beta to stimulate production of filopodia through increased phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate generation. *Mol Cell Biol.* **2008**; Jul;28(14):4549-61.

Kido T, Lau YF. The human Y-encoded testis-specific protein interacts functionally with eukaryotic translation elongation factor eEF1A, a putative oncoprotein. *Int J Cancer.* **2008** Oct 1;123(7):1573-85.

Kim J, Namkung W, Yoon JS, Jo MJ, Lee SH, Kim KH, Kim JY, Lee MG. The role of translation elongation factor eEF1A in intracellular alkalinization-induced tumor cell growth. *Lab Invest.* **2009** Aug;89(8):867-74.

Koiwai K, Maezawa S, Hayano T, Iitsuka M, Koiwai O. BPOZ-2 directly binds to eEF1A1 to promote eEF1A1 ubiquitylation and degradation and prevent translation. *Genes Cells*. **2008** Jun;13(6):593-607.

Leclercq TM, Moretti PA, Vadas MA, Pitson SM. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with sphingosine kinase and directly enhances its catalytic activity. *J Biol Chem*. **2008** Apr 11;283(15):9606-14.

Lee MH, Surh YJ. eEF1A2 as a putative oncogene. *Ann NY Acad Sci*. **2009** Aug;1171:87-93.

Mag M and Engels J. Synthesis and structure assignments of amide protected nucleosides and their use as phosphoramidites in deoxyoligonucleotide synthesis. *Nucleic Acid Res* **1988**; 16: 3525-3543.

Morassutti C, Scaggiante B, Dapas B, Xodo L, Tell G, Quadrifoglio F. Effect of phosphorothioate modifications on the ability of GTn oligodeoxynucleotides to specifically recognize single-stranded DNA-binding proteins and to affect human cancer cellular growth. *Biochimie*. **1999b** Dec;81(12):1115-22.

Morassutti C, Dapas B, Scaggiante B, Paroni G, Xodo L, Quadrifoglio F. Effect of oligomer length and base substitutions on the cytotoxic activity and specific nuclear protein recognition of GTn oligonucleotides in the human leukemic CCRF-CEM cell line. *Nucleosides Nucleotides*. **1999a** Jun-Jul;18(6-7):1711-6.

Panasyuk G, Nemazanyy I, Filonenko V, Negrutskii B, El'skaya AV. A2 isoform of mammalian translation factor eEF1A displays increased tyrosine phosphorylation and ability to interact with different signalling molecules. *Int J Biochem Cell Biol*. **2008**;40(1):63-71.

Scaggiante B e Quadrifoglio F. *WO97/20924*.

Scaggiante B, Morassutti C, Dapas B, Tolazzi G, Ustulin F, Quadrifoglio F. Human cancer cell lines growth inhibition by GTn oligodeoxyribonucleotides recognizing single-stranded DNA-binding proteins. *Eur J Biochem*. **1998** Mar 1;252(2):207-15.

Scaggiante B, Dapas B, Perissin L, Manzini G. Aptameric GT oligomers need to be complexed to ethoxylated polyethylenimine as pre-paired duplexes to efficiently exert their cytotoxic activity in human lymphoblastic cancer cells. *Biochimie*. **2005** Aug;87(8):713-23.

Scaggiante B, Dapas B, Grassi G, Manzini G. Interaction of G-rich GT oligonucleotides with nuclear-associated eEF1A is correlated with their antiproliferative effect in haematopoietic human cancer cell lines. *FEBS J.* **2006** Apr;273(7):1350-61.

Scaggiante B, Dapas B, Cristiano L and Grassi G. The Role of the eEF1A Family in Human Cancers. *Oncogene proteins:new research.* **2008**, chapt.6, p. 177-193, NEW YORK: Arthur H. Malloy and Earl C.Carson

Scaggiante B, Manzini G. EEF1A1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* **2010** 14(4):660-67.

Schlaeger C, Longerich T, Schiller C, Bewerunge P, Mehrabi A, Toedt G, Kleeff J, Ehemann V, Eils R, Lichter P, Schirmacher P, Radlwimmer B. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* **2008** Feb;47(2):511-20.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **1988** Sep 1;48(17):4827-33.

Selga E, Oleaga C, Ramírez S, de Almagro MC, Noé V, Ciudad CJ. Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate. *Genome Med.* **2009** Sep 4;1(9):83.

Sun Y, Wong N, Guan Y, Salamanca CM, Cheng JC, Lee JM, Gray JW, Auersperg N. The eukaryotic translation elongation factor eEF1A2 induces neoplastic properties and mediates tumorigenic effects of ZNF217 in precursor cells of human ovarian carcinomas. *Int J Cancer.* **2008** Oct 15;123(8):1761-9.

Yu, J.Y., DeRuiter, S.L., and Turner, D.L RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**; 99, 6047-6052.

Zhang J, Guo H, Mi Z, Gao C, Bhattacharya S, Li J, Kuo PC.EF1A1-actin interactions alter mRNA stability to determine differential osteopontin expression in HepG2 and Hep3B cells. *Exp Cell Res.* **2009** Jan 15;315(2):304-12.

Zhong D, Zhang J, Yang S, Soh UJ, Buschdorf JP, Zhou YT, Yang D, Low BC. The SAM domain of the RhoGAP DLC1 binds EF1A1 to regulate cell migration. *J Cell Sci.* **2009** Feb 1;122(Pt 3):414-24.

Rivendicazioni

1. Una molecola consistente in un oligonucleotide aptamerico avente la SEQ ID NO.1 e suoi derivati.
2. Una molecola secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'oligonucleotide aptamerico avente la SEQ ID NO.1 sono oligodeossinucleotidi con sequenze GT diverse con orientamento 5'-3' o 3'-5' che non danno luogo a strutture compatibili con le quadruplex di G.
3. Una molecola secondo una delle rivendicazioni 1 e 2, in cui i derivati degli oligodeossinucleotidi sono gli oligoribonucleotidi corrispondenti.
4. Una molecola secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui i derivati sono derivati modificati chimicamente e/o biochimicamente compresi derivati alchilati, fosforotioati e/o coniugati con peptidi, polimeri o PEG e isomeri ottici (spiegelmer).
5. Una molecola secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4 per l'uso come medicamento.
6. Una molecola secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4 per uso nel trattamento di patologie tumorali.
7. Una molecola secondo la rivendicazione 6, in cui le patologie tumorali sono tumori indifferenziati.
8. Una molecola secondo la rivendicazione 6, in cui le patologie tumorali sono epatocarcinoma, osteosarcoma, glioblastoma, adenocarcinoma della prostata, melanoma, colon adenocarcinoma, leucemie, linfomi e carcinoma del polmone.
9. Composizioni farmaceutiche comprendenti quale principio attivo una molecola secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4 in combinazione con opportuni eccipienti, e/o diluenti e/o sistemi di veicolazione per lo stesso.
10. Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 9, in cui tali composizioni sono adatte per la somministrazione sistemica e/o locale.
11. Una molecola secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4 per l'uso come reagente per la diagnosi e/o prognosi di patologie tumorali.
12. Una molecola secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4 come marcatore biologico per monitorare l'efficacia del trattamento terapeutico in patologie

tumorali.

13. Metodo diagnostico per la diagnosi di patologie tumorali mediante l'uso di una molecola secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4 per il rilevamento dell'espressione delle proteine eEF1A.
14. Metodo secondo la rivendicazione 13, comprendente le fasi di:
 - a. fornire un campione biologico da biopsia;
 - b. porre in contatto il campione biologico con una molecola secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4, opzionalmente marcata;
 - c. rilevare la reazione tra la molecola e le proteine della famiglia eEF1A presenti nel campione biologico;
 - d. misurare il segnale di rilevamento dell'avvenuta reazione.
15. Kit diagnostico comprendente almeno un contenitore contenente una molecola consistente secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4, opzionalmente marcata, un contenitore contenente un campione di proteine eEF1A, opzionalmente marcate, ed un foglietto illustrativo per uso diagnostico e/o prognostico in patologie tumorali e/o nel monitoraggio dell'efficacia del trattamento terapeutico in patologie tumorali.

Claims

1. A molecule consisting of an aptamer oligonucleotide having SEQ ID NO.1 and derivatives thereof.
2. A molecule according to claim 1, wherein said derivatives of the aptamer oligonucleotide having SEQ ID NO.1 are oligodeoxynucleotides having different GT sequences with orientation 5'-3' or 3'-5' which do not give rise to compatible structures with G quadruples.
3. A molecule according to claims 1 and 2, wherein said derivatives are the corresponding oligoribonucleotides.
4. A molecule according to claims 1-3, wherein said derivatives are chemically and/or biochemically modified derivatives comprising alkyl derivatives, phosphorothioates and/or conjugated with peptides, polycations or PEGs, and optical isomers (spiegelmer).
5. A molecule according to claims 1-4 for use as a medicament.
6. A molecule according to claims 1-4 for use for the treatment of cancer diseases.
7. A molecule according to claim 6, wherein the cancer diseases are undifferentiated tumors.
8. A molecule according to claim 6, wherein the cancer diseases are hepatocarcinoma, osteosarcoma, glioblastoma, prostate adenocarcinoma, melanoma, colon adenocarcinoma, leukemias, lymphomas and lung carcinoma.
9. Pharmaceutical compositions comprising as active ingredient a molecule according to claims 1-4, in combination with suitable excipients and/or diluents and/or carrier systems for the same.
10. Pharmaceutical compositions according to claim 9, wherein said compositions are for systemic and/or local administration.
11. A molecule according to claims 1-4 for use as reagent for diagnosis and/or prognosis of cancer diseases.
12. A molecule according to claims 1-4 as biological marker for monitoring the efficacy of the therapeutic treatment in cancer diseases.
13. A diagnostic method for diagnosis of cancer diseases by using a molecule

according to claims 1-4 for detecting the eEF1A protein expression.

14. A method according to claim 13, comprising at least the steps of:
 - a. providing a biopsy-type biological sample;
 - b. contacting the biological sample with an optionally labeled molecule according to claims 1-4;
 - c. detecting the reaction between the selected molecule and the proteins from eEF1A family which are present in the biological sample;
 - d. measuring the signal for detection of the occurred reaction.
15. A diagnostic kit comprising at least one vial containing a molecule according to claims 1-4, optionally labeled, and one vial containing a sample of optionally labeled eEF1A proteins, and a leaflet of instructions for use in diagnosis and/or prognosis and/or monitoring the efficacy of the therapeutic treatment in cancer diseases.

Figura 1

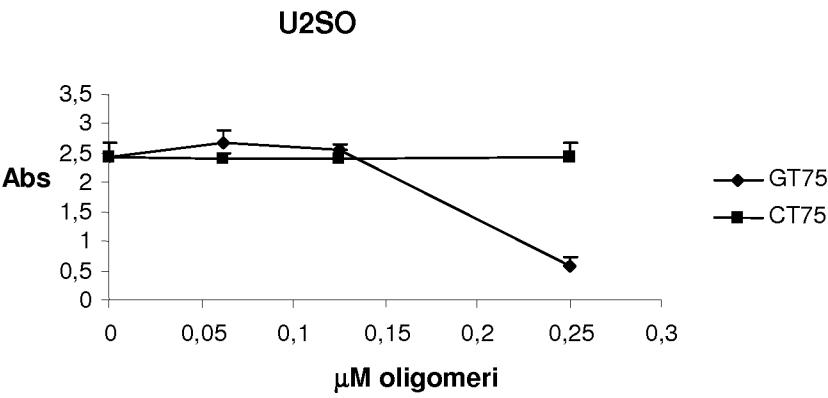


Figura 2

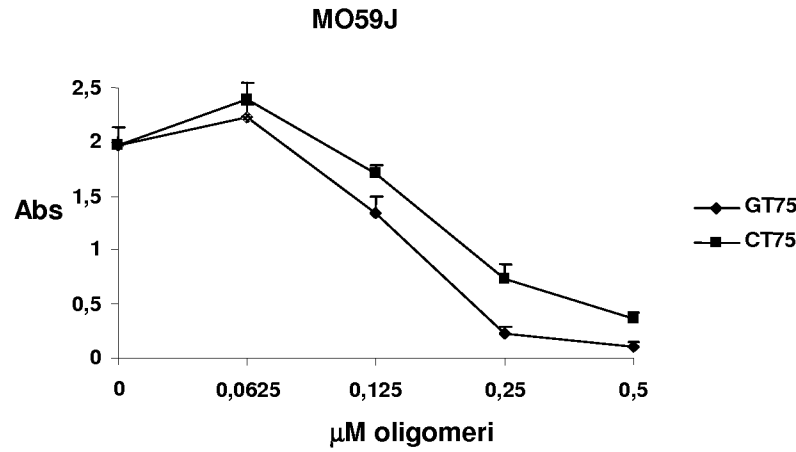


Figura 3

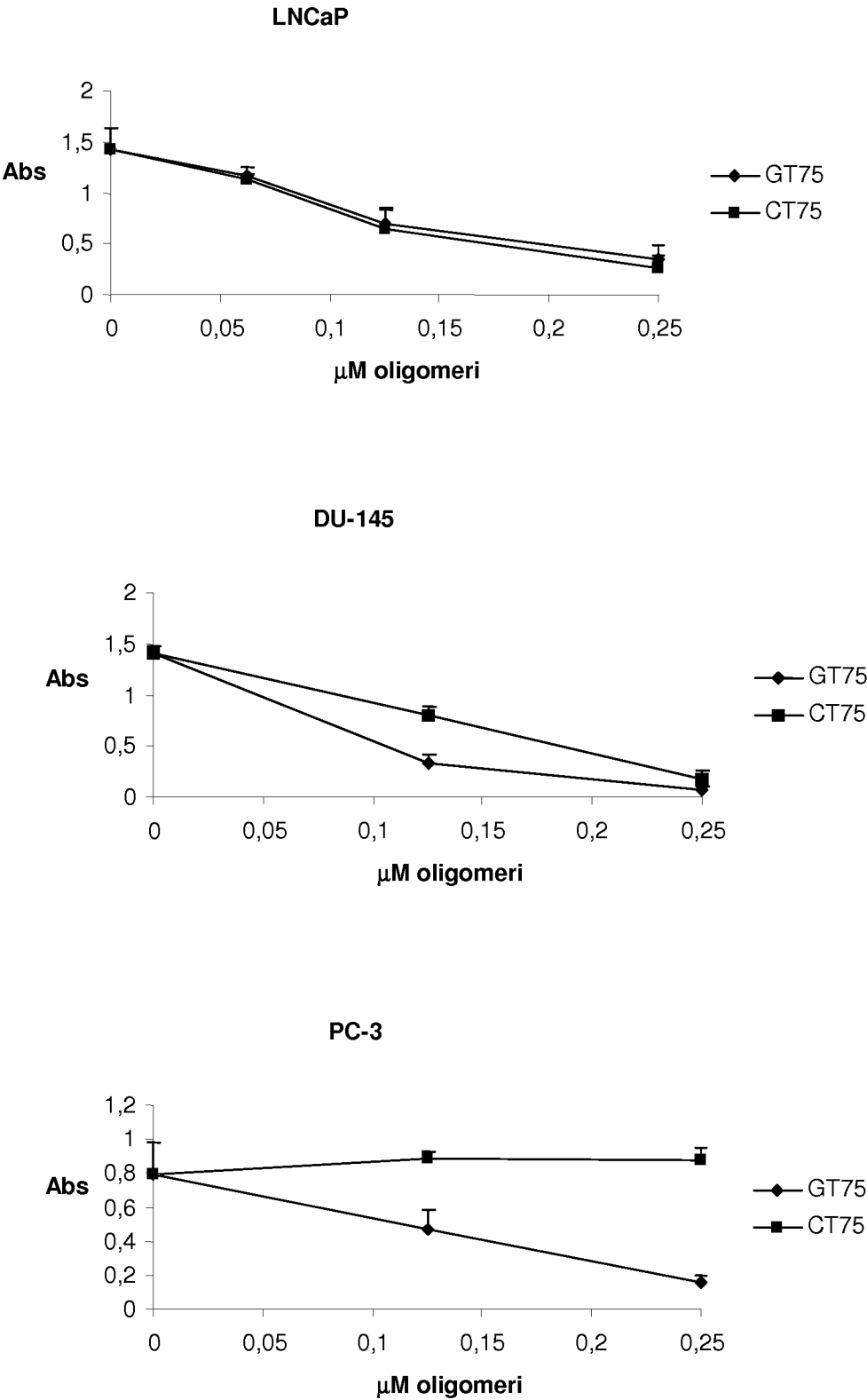


Figura 4

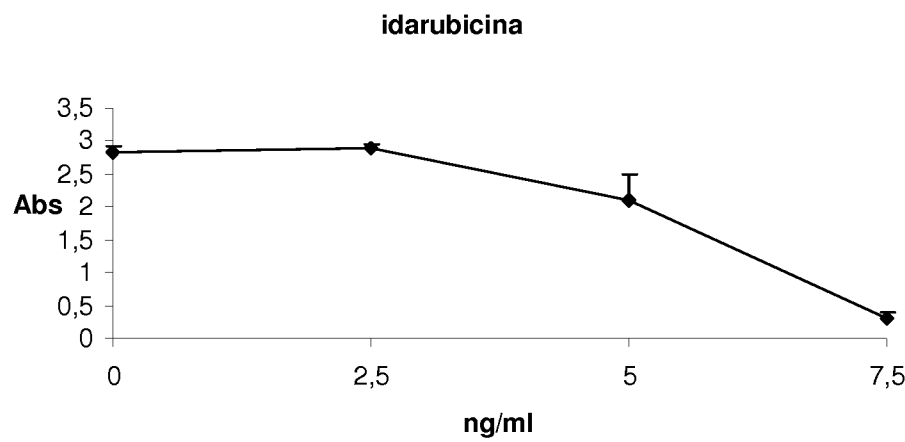


Figura 5

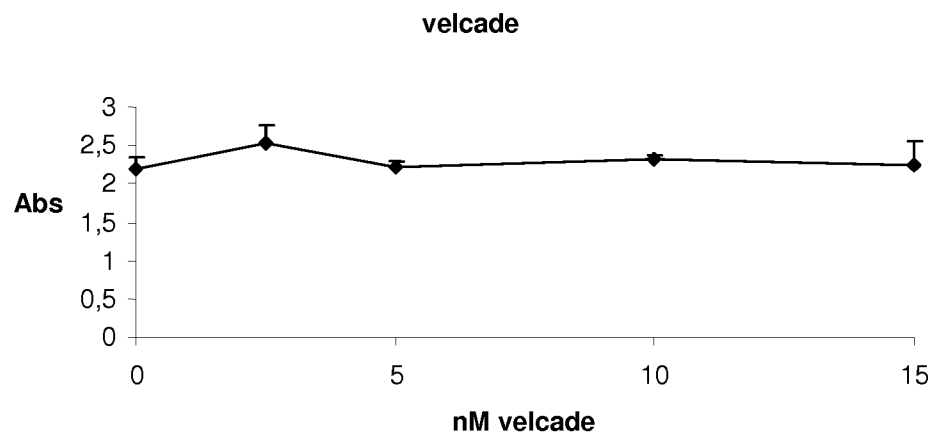


Figura 6

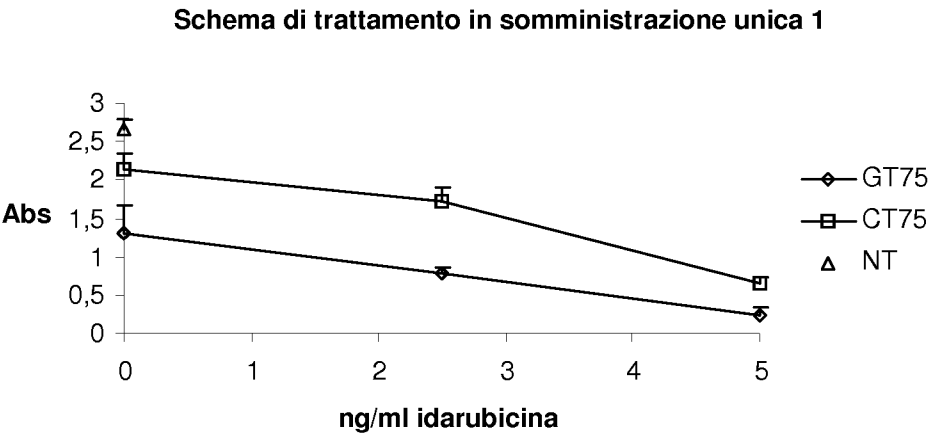


Figura 7

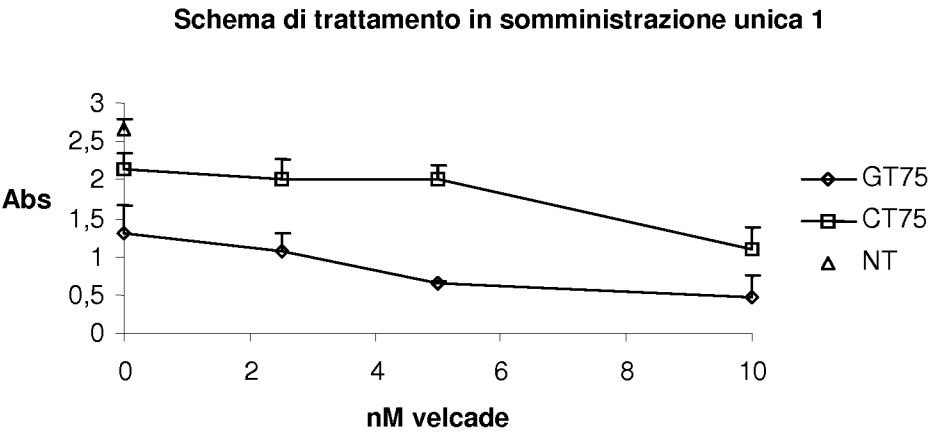


Figura 8

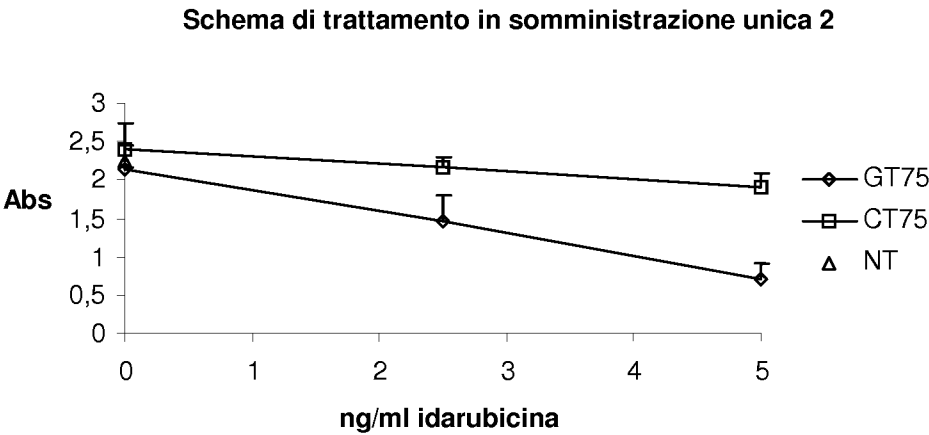


Figura 9

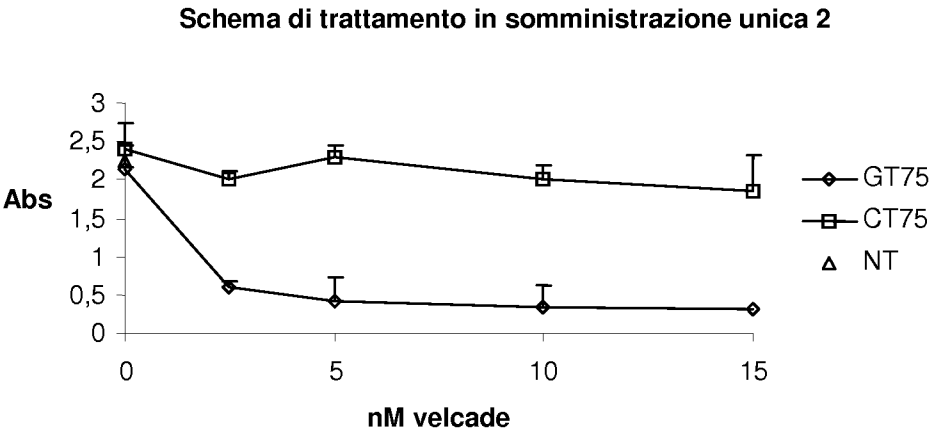


Figura 10

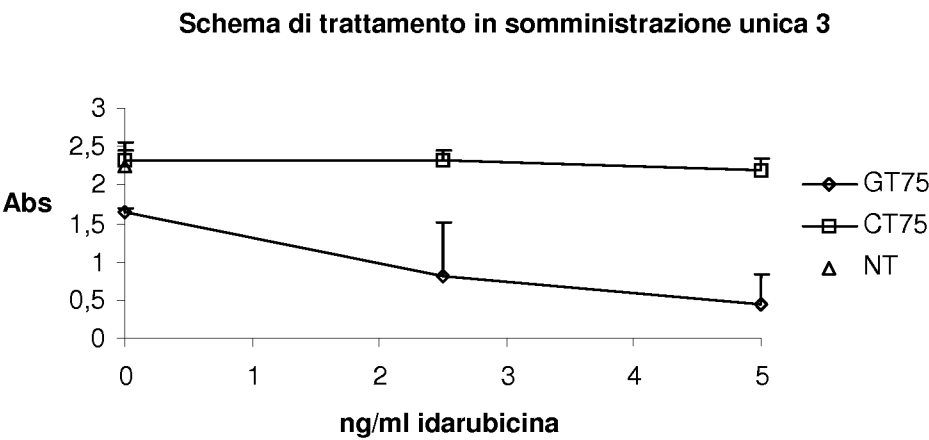


Figura 11

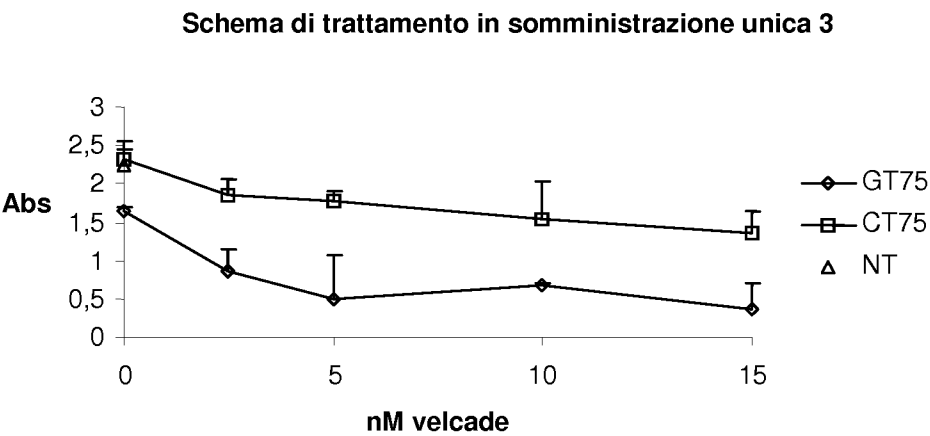


Figura 12

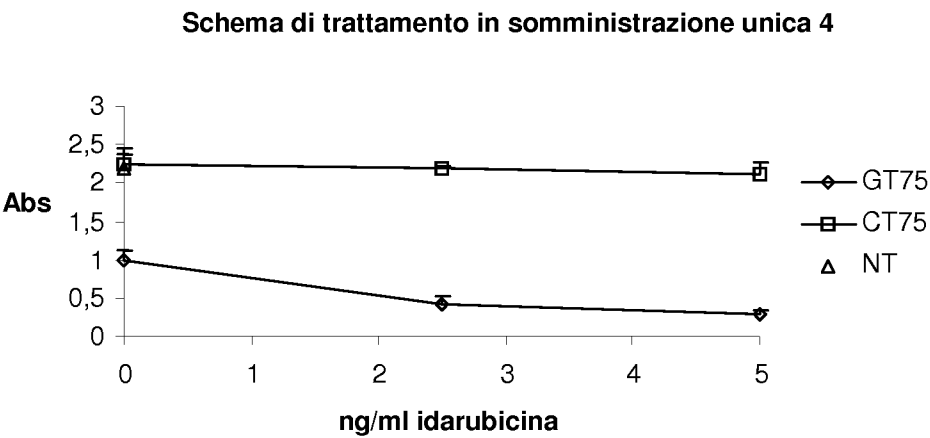


Figura 13

