

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 274**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2015** **PCT/JP2015/063810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015** **WO15178277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2015** **E 15796807 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2022** **EP 3146970**

54 Título: **Fármaco de ácido nucleico para inducir la omisión de variantes exónicas del gen de CD44 y aumentar la expresión de ARNm de CD44 de tipo normal**

30 Prioridad:

19.05.2014 JP 2014103674

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2022

73 Titular/es:

KNC LABORATORIES CO., LTD. (50.0%)
7-1-19 Minatojimaminamimachi, Chuo-ku
Kobe, Hyogo 650-0047, JP y
KOBE GAKUIN EDUCATIONAL FOUNDATION
(50.0%)

72 Inventor/es:

MATSUO, MASAFUMI y
MATSUDA, SEIJI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 930 274 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

Fármaco de ácido nucleico para inducir la omisión de variantes exónicas del gen de CD44 y aumentar la expresión de ARNm de CD44 de tipo normal

Campo técnico

La presente invención se refiere a un fármaco de ácido nucleico que induce la omisión de variantes exónicas del gen de CD44 para aumentar así la expresión de ARNm de CD44 normal.

Antecedentes de la técnica

Recientemente, las células madre cancerosas han atraído la atención en el campo de la terapia y la investigación del cáncer. Se dice que estas células madre cancerosas son una causa que induce la resistencia contra la terapia o la recidiva/metástasis del cáncer.

Una molécula de adhesión CD44, cuyo ligando es el ácido hialurónico y que se expresa en la membrana celular de las células madre cancerosas, es un marcador de células madre cancerosas y está implicada en sus propiedades como células madre cancerosas.

El gen de CD44 comprende 20 exones y produce varias isoformas variantes a través de corte y empalme alternativo (figura 1). Se cree que las isoformas variantes de CD44 (especialmente, CD44v8-10 que comprende las variantes exónicas 8, 9 y 10) que se producen a partir de ARNm variantes de CD44, se unen al transportador de cistina xCT en la membrana celular, promueven la absorción de cistina y aumentan el nivel de glutatión (antioxidante) celular, mejorando así la resistencia contra el estrés oxidativo de los agentes antineoplásicos y la radiación (figura 2). La inserción de estas variantes exónicas no está provocada por anomalías en la secuencia genómica, sino por anomalías en un determinado regulador de corte y empalme específico de las células madre cancerosas (documento no de patente n.º 1).

Bibliografía de la técnica anterior

Documento no de patente

Documento no de patente n.º 1: Cancer Cell 19, 387-400, 15 de marzo de 2011

El documento US 2003/170637 se refiere a un método para analizar variantes de corte y empalme de ARNm.

El documento WO 2006/076021 se refiere a variantes de CD44 como dianas terapéuticas.

Reeder *et al.*, Cancer Research, vol. 58, 3719-3726 (1998) hacen referencia a la expresión de la variante 6 de CD44 antisentido que inhibe la metástasis del tumor colorrectal y el crecimiento del tumor en un entorno de herida.

Harada *et al.*, International Journal of Cancer, vol. 91, 67-75 (2001) hacen referencia a la introducción de ADNc de CD44S antisentido que regula negativamente la expresión de todas las isoformas de CD44 e inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis en células de carcinoma de colon sumamente metastásico.

Naor *et al.*, Critical Review in Clinical Laboratory Science, 39(6), 527-579 (2002) hacen referencia a CD44 en cáncer.

Divulgación de la invención

Problema a solucionar por la invención

Es un objeto de la presente invención, tratar el cáncer inhibiendo la inserción de variantes exónicas en el ARNm del gen de CD44 en células madre cancerosas, para eliminar así las propiedades de estas células y hacer que sean sensibles a agentes antineoplásicos y a la radiación.

Medios para resolver el problema

Como resultado de intensos y prolongados trabajos de investigación, los presentes inventores, que comenzaron con células madre cancerosas que se habían convertido en células madre al producir isoformas anómalas de CD44 a causa de la inserción de variantes exónicas en el gen de CD44 debido a anomalías genéticas, pudieron dirigir con éxito la producción de ARNm de CD44v que codifica isoformas anómalas de CD44 para la producción de ARNm de CD44 normal omitiendo variantes exónicas. Por tanto, se ha conseguido la presente invención. Resumiendo, los oligonucleótidos antisentido (OA) complementarios a las secuencias exónicas, se unen a las secuencias para inhibir así la unión de proteínas nucleicas a los precursores de ARNm. A través de estos procedimientos, los OA inhiben el modo de regulación de corte y empalme e inducen la omisión de cualquier exón(es) deseado(s). Los ARNm variantes del gen de CD44 se generan por anomalías en los reguladores de corte y empalme específicos de las células madre cancerosas. La presente invención induce la omisión de exones inhibiendo el modo de dicha regulación de corte y

empalme con los OA y promueve la producción de CD44 normal.

A continuación se describe un resumen de la presente invención.

- 5 (1) Un oligonucleótido antisentido capaz de inducir la omisión de una o más variantes exónicas del gen de CD44 para aumentar así la expresión de ARNm de CD44 normal, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.
- (2) El oligonucleótido para su uso de acuerdo con el punto (1) anterior, que mejora la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes antineoplásicos y/o a la radiación.
- 10 (3) El oligonucleótido para su uso de acuerdo con el punto (1) o (2) anterior, en donde la variante exónica diana que se va a omitir, es al menos una seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10.
- (4) El oligonucleótido para su uso de acuerdo con el punto (3) anterior, que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte o a la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la variante exónica 8, 9 o 10 del gen de CD44.
- 15 (5) El oligonucleótido para su uso de acuerdo con el punto (4) anterior, que es un oligonucleótido de 20-23 bases que tiene la totalidad o una parte de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 19.
- (6) El oligonucleótido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores, en donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos un nucleótido modificado.
- 20 (7) El oligonucleótido para su uso de acuerdo con el punto (6) anterior, en donde la D-ribofuranosa que constituye el nucleótido modificado está 2'-O, 4'-C-alquilenada.
- (8) Un oligonucleótido de 20-23 bases que tiene la totalidad o una parte de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 19, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo, en donde el oligonucleótido, es un oligonucleótido antisentido que
- 25 se dirige a una o a más variantes exónicas del gen de CD44 y el oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de al menos una variante exónica seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10 del gen de CD44.
- (9) El oligonucleótido de acuerdo con el punto (8) anterior, que comprende al menos un nucleótido modificado, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo.
- 30 (10) El oligonucleótido de acuerdo con el punto (9) anterior, en donde la D-ribofuranosa que constituye el nucleótido modificado está 2'-O, 4'-C-alquilenada, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo.
- (11) Un fármaco para inducir la omisión de al menos una variante exónica seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10 del gen de CD44, que comprende el oligonucleótido de acuerdo con uno cualquiera
- 35 de los puntos (8) a (10) anteriores, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo.
- (12) Una formulación que comprende el oligonucleótido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (8) a (10) y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para administración oral o parenteral
- 40 (13) El oligonucleótido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (8) a (10), para uso como un medicamento.

Efecto de la invención

- La adición de OA a las células madre cancerosas induce la omisión de exones, después de lo cual el nivel de ARNm de CD44v disminuye y la producción de ARNm de CD44 normal aumenta en las células madre cancerosas que han estado produciendo ARNm de CD44v. Después de la producción de la proteína CD44 normal, se recupera la
- 45 sensibilidad a agentes antineoplásicos y a la radioterapia y se espera una curación completa del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

- 50 [Fig. 1] Se trata de un dibujo esquemático que muestra que el gen de CD44 comprende 20 exones y que a través de un corte y empalme alternativo se produce un ARNm variante de CD44 (CD44v8-10).
- [Fig. 2] Se trata de un dibujo esquemático que muestra el mecanismo subyacente a la tolerancia de la variante de CD44 de las células madre cancerosas. Una isoforma variante de CD44 (CD44v8-10) producida a partir del ARNm variante de CD44 (CD44v8-10) se une al transportador de cistina xCT en la membrana celular, promueve la
- 55 absorción de cistina y aumenta el nivel de glutatión intracelular (antioxidante), mejorando así la resistencia al estrés oxidativo de los agentes antineoplásicos y a la radiación.
- [Fig. 3] En esta figura se muestran las ubicaciones de las secuencias de los OA (OA n.º 1 a n.º 4 y OA n.º 12 a n.º 14), sintetizadas en los Ejemplos descritos más adelante, que son complementarias al ARNm de CD44v8. Las secuencias de nucleótidos de OA n.º 1 a n.º 4 se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 4, respectivamente. La secuencia
- 60 de nucleótidos del ARNm de CD44v8 se muestra en SEQ ID NO: 20.
- [Fig. 4] En esta figura se muestran las ubicaciones de las secuencias de los OA (OA n.º 5 a n.º 10 y OA n.º 15) sintetizadas en los Ejemplos descritos más adelante que son complementarias al ARNm de CD44v9. Las secuencias de nucleótidos de OA n.º 5 a n.º 10 se muestran en las SEQ ID NO: 5 a 10, respectivamente. La secuencia de nucleótidos del ARNm de CD44v9 se muestra en SEQ ID NO: 21.
- 65 [Fig. 5] En esta figura se muestran las ubicaciones de las secuencias de los OA (OA n.º 11 y OA n.º 16 a n.º 19) sintetizadas en los Ejemplos descritos más adelante que son complementarias al ARNm de CD44v10. La

secuencia de nucleótidos del OA n.º 11 se muestra en SEQ ID NO: 11. La secuencia de nucleótidos del ARNm de CD44v10 se muestra en SEQ ID NO: 22.

[Fig. 6] En esta figura se muestra la estructura de ENA™ (ácidos nucleicos unidos mediante puentes de 2'-O,4'-C-etileno).

[Fig. 7] En esta figura se muestra el efecto de la inducción de la omisión de exones con los OA (OA n.º 1 a n.º 4 y OA n.º 12 a n.º 14) que son complementarios a la secuencia de ARNm de CD44v8 en células KATOIII.

[Fig. 8] En esta figura se muestra el efecto de la inducción de la omisión de exones con los OA (OA n.º 5 a n.º 10 y OA n.º 15) que son complementarios a la secuencia de ARNm de CD44v9 en células KATOIII.

[Fig. 9] En esta figura se muestra el efecto de la inducción de la omisión de exones con los OA (OA n.º 11 y OA n.º 16 a n.º 19) que son complementarios a la secuencia de ARNm de CD44v10 en células KATOIII.

[Fig. 10] En esta figura se muestran los resultados del OA n.º 7 (10 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM) que mostró el mayor efecto de inducción de omisión de exones.

[Fig. 11] En esta figura se muestran gráficamente los resultados del OA n.º 7 (10 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM) que mostró el mayor efecto de inducción de omisión de exones.

[Fig. 12] En esta figura se muestra el efecto de la inducción de omisión de exones con un OA (OA n.º 7) que es complementario a la secuencia de ARNm de CD44v9 en células HT29.

[Fig. 13] En esta figura se muestra el efecto de inhibición del crecimiento en células cancerosas (células KATOIII) mejorando la resistencia al tratamiento con CDDP (cisplatino) utilizando el OA n.º 7, que fue el más eficaz para inducir la omisión de exones de ARNm de CV44v.

[Fig. 14] En esta figura se muestra una comparación de los efectos de inhibición del crecimiento de células cancerosas (células KATOIII) del OA n.º 7, que fue el más eficaz para inducir la omisión de exones de ARNm de CD44v y del OA n.º 12, que apenas afectó a la omisión de exones de ARNm de CD44v9.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, se describirán en mayor detalle realizaciones de la presente invención.

La presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido capaz de inducir la omisión de una o más variantes exónicas del gen de CD44 para aumentar así la expresión de ARNm de CD44 normal, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

El oligonucleótido antisentido de la presente invención, puede dirigirse a cánceres que expresan variantes exónicas del gen de CD44. Como ejemplos específicos de dichos cánceres se incluyen, pero sin limitación, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides y carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. Entre estos, se prefieren los cánceres que expresan al menos una de las variantes exónicas CD44v8, CD44v9 y CD44v10. Como ejemplos específicos de dichos cánceres se incluyen, pero sin limitación, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón y carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Dado que el oligonucleótido antisentido de la presente invención es capaz de mejorar la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes antineoplásicos y/o a la radiación, el oligonucleótido antisentido de la presente invención puede administrarse a los pacientes junto con quimioterapia o radioterapia.

La variante exónica diana a omitir con el oligonucleótido antisentido de la presente invención, puede ser al menos una seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas exones 8, 9 y 10.

El oligonucleótido antisentido puede dirigirse a una o a más variantes exónicas del gen de CD44. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido que comprenda una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia que consiste en 20-23 nucleótidos consecutivos en la secuencia de nucleótidos que codifica la variante 8, 9 o 10 del gen de CD44. Resumiendo, el oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte o a la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la variante exónica 8, 9 o 10 del gen de CD44. Las secuencias de nucleótidos de los ARNm de las variantes exónicas 8, 9 y 10 del gen de CD44 se muestran en las SEQ ID NO: 20 a 22, respectivamente.

El oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte o a la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la variante exónica 8, 9 o 10 del gen de CD44, puede ser un ejemplo de los que tienen una parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 19. La longitud de dichos oligonucleótidos es adecuadamente de 18-25 bases, preferentemente de 18-23 bases, y más preferentemente de 20-23 bases.

Los nucleótidos que constituyen el oligonucleótido antisentido pueden ser ADN natural, ARN natural, o ADN o ARN modificado. Preferentemente, al menos uno de los nucleótidos es un nucleótido modificado.

Como ejemplos de nucleótidos modificados se incluyen los nucleótidos en los que se modifica el azúcar (p. ej., la D-ribofuranosa está 2'-O-alkilada o la D-ribofuranosa está 2'-O, 4'-C-alkilada), los nucleótidos en los que se modifica el enlace fosfodiéster (p. ej., tioados), los nucleótidos en los que se modifica la base, una combinación de los

nucleótidos descritos anteriormente, etcétera. Los oligonucleótidos antisentido, en los que al menos una D-ribofuranosa que constituye los oligonucleótidos está 2'-O-alquilada o 2'-O,4'-C-alquilenada, tienen alta fuerza de unión al ARN y alta resistencia a nucleasas. Por tanto, se espera que produzcan un mayor efecto terapéutico que los nucleótidos naturales (es decir, oligo ADN u oligo ARN). Adicionalmente, los oligonucleótidos en los que al menos un enlace fosfodiéster que constituye los oligonucleótidos, está tioado, también tienen alta resistencia a nucleasas y, por tanto, se espera que produzcan mayor efecto terapéutico que los nucleótidos naturales (es decir, oligo ADN u oligo ARN). Los oligonucleótidos que comprenden tanto el azúcar modificado como el fosfato modificado, como se ha descrito anteriormente, tienen una resistencia aún mayor a las nucleasas y, por tanto, se espera que produzcan un efecto terapéutico aún mayor.

Con respecto al oligonucleótido antisentido, como ejemplos de azúcares modificados se incluyen, pero sin limitación, D-ribofuranosa como 2'-O-alquilada (por ejemplo, 2'-O-metilada, 2'-O-aminoetilada, 2'-O-propilada, 2'-O-alilada, 2'-O-metoxietilada, 2'-O-butilada, 2'-O-pentilada o 2'-O-propargilada); D-ribofuranosa como 2'-O,4'-C-alquilenada (p. ej., 2'-O,4'-C-etilenada, 2'-O,4'-C-metilenada, 2'-O,4'-C-propilenada, 2'-O,4'-C-tetrametilada o 2'-O,4'-C-pentametilada); 3'-desoxi-3'-amino-2'-desoxi-D-ribofuranosa; y 3'-desoxi-3'-amino-2'-desoxi-2'-fluoro-D-ribofuranosa.

Con respecto al oligonucleótido antisentido, como ejemplos de la modificación del enlace fosfodiéster se incluyen, pero sin limitación, enlace de fosforotioato, enlace de metilfosfonato, enlace de metiltiofosfonato, enlace de fosforoditioato y enlace de fosforoamidato.

Como ejemplos de bases modificadas se incluyen, pero sin limitación, citosina como 5-metilada, 5-fluorada, 5-bromada, 5-yodada o N4-metilada; timidina como 5-desmetilada (uracilo), 5-fluorada, 5-bromada o 5-yodada; adenina como N6-metilada u 8-bromada; y guanina como N2-metilada u 8-bromada.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a las sales del oligonucleótido antisentido. Como ejemplos de dichas sales se incluyen, pero sin limitación, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de litio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y sales de magnesio; sales metálicas, tales como sales de aluminio, sales de hierro, sales de cinc, sales de cobre, sales de níquel o sales de cobalto; sales de amina, incluidas sales inorgánicas, tales como sales de amonio y sales orgánicas, tales como sales de t-octilamina, sales de dibencilamina, sales de morfolina, sales de glucosamina, sales de éster alquílico de fenilglicina, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de guanidina, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de dicitclohexilamina, sales de N,N'-dibenciletilendiamina, sales de cloroprocaina, sales de procaina, sales de dietanolamina, sales de N-bencil-fenetilamina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio o sales de tris(hidroximetil)aminometano; sales de ácidos inorgánicos, incluidas sales de ácidos hidrácidos tales como fluorohidratos, clorhidratos, bromhidratos o yodhidratos, nitratos, percloratos, sulfatos o fosfatos; sales de ácidos orgánicos incluyendo sales de ácidos alcanosulfónicos inferiores tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos o etanosulfonatos, sales de ácido arilsulfónico tales como bencenosulfonatos o p-toluenosulfonatos, acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartratos, oxalatos o maleatos; y sales de aminoácidos, tales como sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina, sales de ornitina, sales de ácido glutámico o sales de ácido aspártico. Estas sales pueden prepararse mediante métodos conocidos.

El oligonucleótido antisentido a veces se presenta como un solvato (p. ej., hidrato). El oligonucleótido antisentido de la presente invención puede ser un solvato de este tipo.

Adicionalmente, el oligonucleótido antisentido puede administrarse en forma de profármaco. Como ejemplos de dichos profármacos se incluyen, pero sin limitación, amidas, ésteres, carbamatos, carbonatos, ureidos y fosfatos. Estos profármacos pueden prepararse mediante métodos conocidos.

El oligonucleótido antisentido puede sintetizarse con un sintetizador de ADN disponible en el comercio (p. ej., PerkinElmer Modelo 392 basado en el método de la fosforamidita) de acuerdo con el método descrito en Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984) con las modificaciones necesarias. Como reactivos de fosforamidita para utilizar en el proceso, en el comercio se dispone de nucleósidos naturales y de 2'-O-metilnucleósidos (es decir, 2'-O-metilguanosina, 2'-O-metiladenosina, 2'-O-metilcitosina y 2'-O-metiluridina). En cuanto a la 2'-O-alquilguanosina, -alquiladenosina, -alquilcitosina y -alquiluridina, en las que el número de carbonos del grupo alquilo es 2-6, pueden emplearse los siguientes métodos.

La 2'-O-aminoetilguanosina, -aminoetiladenosina, -aminoetilcitosina y -aminoetiluridina, pueden sintetizarse como se ha descrito anteriormente (Blommers *et al.*, Biochemistry 1998, 37, 17714-17725).

La 2'-O-propilguanosina, -propiladenosina, -propilcitosina y -propiluridina, pueden sintetizarse como se ha descrito anteriormente (Lesnik, E.A. *et al.*, Biochemistry 1993, 32, 7832-7838).

Para la síntesis de 2'-O-alilguanosina, -aliladenosina, -alilcitosina y -aliluridina, pueden usarse reactivos disponibles en el comercio.

La 2'-O-metoxietilguanosina, -metoxietil adenosina, -metoxietilcitosina y -metoxietiluridina, pueden sintetizarse como

se ha descrito anteriormente (patente de EE. UU. n.º 6261840 o Martin, P. Helv. Chim. Acta. (1995) 78, 486-504).

La 2'-O-butilguanosina, -butiladenosina, -butilcitosina y -butiluridina, pueden sintetizarse como se ha descrito anteriormente (Lesnik, E.A. *et al.*, Biochemistry 1993, 32, 7832-7838).

La 2'-O-pentilguanosina, -pentiladenosina, -pentilcitosina y -pentiluridina, pueden sintetizarse como se ha descrito anteriormente (Lesnik, E.A. *et al.*, Biochemistry 1993, 32, 7832-7838).

Para la síntesis de 2'-O-propargilguanosina, -propargiladenosina, -propargilcitosina y -propargiluridina, pueden usarse reactivos disponibles en el comercio.

La 2'-O,4'-C-metilenguanosina, 2'-O,4'-C-metilenadenosina, 5-metilcitosina y 5-metiltimidina, pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en el documento WO99/14226; y la 2'-O,4'-C-alquilenguanosina, 2'-O,4'-C-alquilenadenosina, 5-metilcitosina y 5-metiltimidina, en las que el número de carbonos del grupo alquileo es de 2-5, pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en el documento WO00/47599.

Un oligonucleótido antisentido puede sintetizarse con enlaces de fosforotioato acoplando reactivos de fosforamidita y la posterior reacción con azufre, disulfuro de tetraetiluramo (TDTD; Applied Biosystems, Reactivo de Beaucage (Glen Research) o un reactivo tal como hidruro de xantano (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991); J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990); PCT/WO98/54198).

Como vidrio de poro controlado (VPC) para utilizar en un sintetizador de ADN, en el comercio se dispone de VPC unido a 2'-O-metilnucleósido. En lo que respecta a la 2'-O,4'-C-metilenguanosina, 2'-O,4'-C-metilenadenosina, 5-metilcitosina y 5-metiltimidina, estas pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en el documento WO99/14226; y en lo que respecta a la 2'-O,4'-C-alquilenguanosina, 2'-O,4'-C-alquilenadenosina, 5-metilcitosina y 5-metiltimidina, en las que el número de carbonos del grupo alquileo es de 2-5, estas pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en el documento WO00/47599. Los nucleósidos así preparados pueden unirse a VPC como se ha descrito anteriormente (Oligonucleotide Synthesis, Editado por M. J. Gait, Oxford University Press, 1984). Usando el VPC modificado (como se desvela en el Ejemplo 12b de la publicación de patente japonesa no examinada n.º Hei7-87982), se puede sintetizar un oligonucleótido en el que en el extremo 3' se une un grupo 2-hidroxi-etilfosfato. Si se utiliza 3'-amino-Modificador C3 VPC, 3'-amino-Modificador C7 VPC o Gliceril VPC (Glen Research) o 3'-espaciador C3 SynBase CPG 1000 o 3'-espaciador C9 SynBase CPG 1000 (Link Technologies), se puede sintetizar un oligonucleótido en el que en el extremo 3' se une un grupo hidroxialquilfosfato o aminoalquilfosfato.

Cuando para el tratamiento del cáncer se utiliza el oligonucleótido antisentido de la presente invención, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo, estos pueden administrarse tal cual o mezclarse con excipientes, diluyentes y similares apropiados, farmacéuticamente aceptables, para administración oral en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, jarabes, etc. o para administración parenteral en forma de inyecciones, supositorios, parches o preparaciones externas.

Estas formulaciones pueden prepararse mediante métodos bien conocidos utilizando aditivos tales como excipientes (p. ej., excipientes orgánicos que incluyan derivados de azúcar tales como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol o sorbitol; derivados de almidón, tales como almidón de maíz, almidón de patata, α -almidón o dextrina; derivados de celulosa tales como celulosa cristalina; goma arábiga; dextrano; o pululano; y excipientes inorgánicos, incluidos los derivados de silicato, tales como ácido silícico anhidro ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio o aluminometasilicato de magnesio; fosfatos tales como hidrógenofosfato de calcio; carbonatos tales como carbonato de calcio; y sulfatos tales como sulfato de calcio), lubricantes (p. ej., ácido esteárico; sales de metales de ácido esteárico tales como estearato de calcio o estearato de magnesio; talco; sílice coloidal; ceras tales como cera de abejas y esperma de ballena; ácido bórico; ácido adípico; sulfatos tales como sulfato de sodio; glicol; ácido fumárico; benzoato de sodio; DL-leucina; laurilsulfatos tales como laurilsulfato de sodio o laurilsulfato de magnesio; compuestos de ácido silícico tales como anhídrido silícico e hidrato silícico; o los derivados de almidón enumerados anteriormente), aglutinantes (p. ej., hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol, o compuestos similares a los excipientes mencionados anteriormente), disgregantes (p. ej., derivados de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio o carboximetilcelulosa de sodio reticulada internamente; y derivados de celulosa/almidón modificados químicamente tales como carboximetilalmidón, carboximetilalmidón sódico o polivinilpirrolidona reticulada), emulsionantes (p. ej., arcilla coloidal tal como bentonita o veegum; hidróxidos metálicos tales como hidróxido de magnesio o hidróxido de aluminio; tensioactivos aniónicos tales como laurilsulfato de sodio o estearato de calcio; tensioactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio; o tensioactivos no iónicos tales como polioxietilentalquiléter, éster de ácido graso de polioxietilen sorbitán o ésteres de sacarosa de ácidos grasos), estabilizadores (p. ej., ésteres de p-hidroxibenzoato tales como metilparabeno o propilparabeno; alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico y alcohol feniletílico; cloruro de benzalconio; fenoles tales como fenol o cresol; timerosal; ácido deshidroacético; o ácido sórbico), agentes aromatizantes (p. ej., edulcorantes de uso convencional, acidificantes, aromatizantes y similares) o diluyentes.

El fármaco para el tratamiento del cáncer comprende preferentemente 0,05-5 μ moles/ml, más preferentemente 0,1-1 μ mol/ml de oligonucleótido antisentido, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, solvato del mismo o profármaco

del mismo; 0,02-10 % p/v de hidrato de carbono o polialcohol; y 0,01-0,4 % p/v de tensioactivo farmacológicamente aceptable.

Como el hidrato de carbono anterior, se prefieren especialmente los monosacáridos y/o disacáridos. Como ejemplos específicos de estos hidratos de carbono y polialcoholes se incluyen, pero sin limitación, glucosa, galactosa, manosa, lactosa, maltosa, manitol y sorbitol. Estos pueden usarse individualmente o combinados.

Los ejemplos preferibles del tensioactivo incluyen, pero sin limitación, mono-, di- o triéster de poliolxietilén sorbitán alquilfenilpolioxietileno, taurocolato de sodio, colato de sodio y ésteres de polialcohol. Entre estos, son especialmente preferibles el mono-, di- o triéster de poliolxietilén sorbitán, siendo los ésteres más preferibles el oleato, laurato, estearato y palmitato. Estos pueden usarse individualmente o combinados.

Más preferentemente, para el tratamiento del cáncer, el fármaco comprende 0,03-0,09 M de sal neutra farmacológicamente aceptable, tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio y/o cloruro de calcio.

Incluso más preferentemente, para el tratamiento del cáncer, el fármaco puede comprender 0,002-0,05 M de un tampón farmacológicamente aceptable. Como ejemplos preferidos de tampón se incluyen, pero sin limitación, citrato de sodio, glicinato de sodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)aminometano. Estos tampones pueden usarse individualmente o combinados.

Adicionalmente, el fármaco descrito anteriormente puede suministrarse en estado de solución. Sin embargo, en el caso de que sea necesario almacenarlo durante un período de tiempo determinado, el fármaco se liofiliza preferentemente para estabilizar el oligonucleótido antisentido e impedir así la disminución de su efecto terapéutico. Cuando se liofiliza, el fármaco puede reconstruirse con una solución, tal como agua destilada para inyección, justo antes de su uso. Por tanto, para su administración, el fármaco regresa al estado líquido. Por lo tanto, el fármaco para el tratamiento del cáncer comprende uno en estado liofilizado que se utiliza después de reconstruirlo con una solución, de modo que los componentes respectivos se encuentren dentro de los intervalos de concentración especificados. Con el fin de promover la solubilidad del producto liofilizado, el fármaco puede comprender además albúmina y aminoácidos tales como glicina.

Cuando el oligonucleótido antisentido de la invención, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo, se administra a un ser humano, el oligonucleótido antisentido o similar puede administrarse, por ejemplo, a aproximadamente 0,1-100 mg/kg (peso corporal), preferentemente a 1-50 mg/kg (peso corporal) por adulto por día por vía oral o intravenosa. Esta dosis puede administrarse una vez o puede dividirse en varias veces al día. La dosis y el número de veces de administración pueden modificarse de forma adecuada dependiendo del tipo y de los síntomas de la enfermedad, de la edad del paciente, de la vía de administración, etc.

La administración del oligonucleótido antisentido de la invención, de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de un solvato del mismo o de un profármaco del mismo, a pacientes con cáncer, puede realizarse, por ejemplo, como se describe a continuación. Resumiendo, el oligonucleótido antisentido, la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el solvato del mismo o el profármaco del mismo, se prepara mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia y se esterilizan mediante métodos convencionales para preparar, por ejemplo, 1 200 µg/ml de una solución inyectable. Esta solución se instila a un paciente por vía intravenosa, por ejemplo, en forma de infusión, para que la dosis del oligonucleótido antisentido sea, por ejemplo, de 20 mg por kg de peso corporal. Esta administración se repite, por ejemplo, 4 veces a intervalos de 2 semanas. Posteriormente, este tratamiento se repite apropiadamente mientras se confirma el efecto de la reducción del tumor midiendo dicho tumor a través de una exploración física, fotografías de rayos X, imágenes de tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM), examen ultrasónico, confirmación con endoscopio y laparoscopia, evaluación con marcadores tumorales, citología e histología.

La presente invención también proporciona un oligonucleótido de 20-23 bases que tiene la totalidad o una parte de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEQ ID NO: 2 a 19, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo, en donde el oligonucleótido, es un oligonucleótido antisentido que se dirige a una o a más variantes exónicas del gen de CD44 y el oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de al menos una variante exónica seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10 del gen de CD44.

Ventajosamente, el oligonucleótido de la presente invención puede comprender al menos un nucleótido modificado. El oligonucleótido modificado es como se ha descrito anteriormente. Ventajosamente, la D-ribofuranosa que constituye el nucleótido modificado puede estar 2'-O,4-C-alkilenada (p. ej., 2'-O,4-C-etilenada, 2'-O,4-C-metilenada, 2'-O,4-C-propilenada, 2'-O,4-C-tetrametilenada o 2'-O,4-C-pentametilenada).

El oligonucleótido de la presente invención puede prepararse de acuerdo con el método descrito anteriormente para la preparación de oligonucleótidos antisentido. Las sales farmacéuticamente aceptables, los solvatos y profármacos del oligonucleótido de la presente invención, son los mismos que los se describen para dichas sales, solvatos y profármacos del oligonucleótido antisentido.

El oligonucleótido de la presente invención es capaz de inducir la omisión de al menos una variante exónica seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10 del gen de CD44. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un fármaco para inducir la omisión de al menos una variante exónica seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10 del gen de CD44, que comprende el oligonucleótido descrito anteriormente, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo. El fármaco de inducción de omisión de la presente invención, puede usarse como un medicamento o como un reactivo en los experimentos.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos Ejemplos.

[Ejemplo 1] Síntesis de oligonucleótidos antisentido (OA)

Se sintetizaron los oligonucleótidos antisentido (OA) que se muestran en la Tabla 1. En las figuras 3 a 5 se muestran las ubicaciones de las secuencias de los OA que son complementarias al ARNm variante de CD44. En las secuencias de los OA, se introdujo ácido nucleico modificado ENA™ (ácidos nucleicos unidos mediante puentes de 2'-O,4'-C-etileno) en C (citocina) y T (timina) para proporcionar afinidad y la estabilidad.

Tabla 1

Abreviatura	Designación	secuencia de OA
OA n.º 1	OAE44E13-0120	5'-actatgactggagtcacat-3' (SEQ ID NO: 1)
OA n.º 2	OAE44E13-2320	5'-ttgcagtaggctgaagcgtt-3' (SEQ ID NO: 2)
OA n.º 3	OAE44E13-4020	5'-caaacctgtgttgattg-3' (SEQ ID NO: 3)
OA n.º 4	OAE44E13-7020	5'-aagaggctcgtcctgtcca-3' (SEQ ID NO: 4)
OA n.º 5	OAE44E14-0120	5'-gctctgagaattactctgct-3' (SEQ ID NO: 5)
OA n.º 6	OAE44E14-2020	5'-cttcattgtatgtagagaag-3' (SEQ ID NO: 6)
OA n.º 7	OAE44E14-3020	5'-tctccaagccttcattgta-3' (SEQ ID NO: 7)
OA n.º 8	OAE44E14-4420	5'-gatgggtcttattcttcc-3' (SEQ ID NO: 8)
OA n.º 9	OAE44E14-5720	5'-gtagaagttgttgatggtc-3' (SEQ ID NO: 9)
OA n.º 10	OAE44E14-7120	5'-tgcttgatgtcagagtagaa-3' (SEQ ID NO: 10)
OA n.º 11	OAE44E15-9420	5'-gaaggctcgtcttcttcg-3' (SEQ ID NO: 11)
OA n.º 12	OAE44E13-4420	5'-ccaccaaacctgtgttga-3' (SEQ ID NO: 12)
OA n.º 13	OAE44E13-5720	5'-ctgtccaatctccaccaa-3' (SEQ ID NO: 13)
OA n.º 14	OAE44E13-8320	5'-gcgtgtcattgaagaggt-3' (SEQ ID NO: 14)
OA n.º 15	OAE44E14-2820	5'-ttccaagccttcattgatg-3' (SEQ ID NO: 15)
OA n.º 16	OAE44E15-1320	5'-gtctcttctccacctgta-3' (SEQ ID NO: 16)
OA n.º 17	OAE44E15-4920	5'-ttccagtaaagtagtgagc-3' (SEQ ID NO: 17)
OA n.º 18	OAE44E15-13020	5'-tccaaggaccagctcttag-3' (SEQ ID NO: 18)
OA n.º 19	OAE44E15-16020	5'-gttggatctccaacagtaa-3' (SEQ ID NO: 19)

Síntesis de HO-ACTATGACTGGAGTCCATAT-OH (OA n.º 1)

La síntesis se realizó con un sintetizador de ácido nucleico automatizado (modelo de sintetizador de ADN/ARN NTS H-8: Nihon Techno Service Co., Ltd.) a una escala de 1 µmol. Las concentraciones de los disolventes, de los reactivos y de las fosforamiditas en cada ciclo de síntesis, fueron las mismas que las concentraciones utilizadas en la síntesis de oligonucleótidos naturales. Los reactivos y las fosforamiditas de 2'-O-metilnucleósido (para la adenosina: N.º de producto 10-3100-10; para la guanosina: N.º de producto 10-3121-10; para la citidina: N.º de producto 10-3110-10; y para la uridina: N.º de producto 10-3130-10) estaban disponibles en Glen Research. Los disolventes utilizados eran productos de Wako Pure Chemical Industries. Las fosforamiditas no naturales utilizadas fueron los siguientes compuestos desvelados en la publicación de patente japonesa no examinada N.º 2000-297097 del ejemplo 22 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etilen-4-N-benzoil-5--metilcitidin-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforamidita) y Ejemplo 9 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etilen-5-metiluridin-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforamidita). Como transportador sólido, se utilizó vidrio de poro controlado (VPC) (N.º de producto BG5-3400-B; Biosearch). Por tanto, se sintetizó el compuesto del título. Cabe señalar aquí que el tiempo necesario para la condensación de las amiditas se estableció en 15 minutos.

Los análogos de oligonucleótidos protegidos con una secuencia de interés se trataron con amoníaco acuoso espeso para cortar así los oligómeros del soporte y, al mismo tiempo, eliminar el grupo protector cianoetilo de los átomos de fósforo y el grupo protector de las nucleobases. El disolvente se evaporó a presión reducida; el residuo restante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó

reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

- 5 El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz en tiempo de vuelo) de iones negativos (valor calculado: 6891,8; valor medido: 6895.51).

10 La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35228064 a 35228083 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-TTGCAGTAGGCTGAAGCGTT-OH (OA n.º 2)

- 15 El compuesto del Ejemplo 2 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

25 El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6937,8; valor medido: 6936.09).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35228086 a 35228105 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-CAAACCTGTGTTTGGATTTG-OH (OA n.º 3)

- 30 El compuesto del Ejemplo 3 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

40 El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6911,7; valor medido: 6910.09).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35228103 a 35228122 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

45 Síntesis de HO-AAGAGGTCCTGTCTGTCCA-OH (OA n.º 4)

- 50 El compuesto del Ejemplo 4 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6908,9; valor medido: 6907.10).

60 La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35228133 a 35228152 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-GCCTTGAGAATTACTCTGCT-OH (OA n.º 5)

- 65 El compuesto del Ejemplo 5 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase

inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6896,8; valor medido: 6899.98).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35229924 a 35229943 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-CTTCATGTGATGTAGAGAAG-OH (OA n.º 6)

El compuesto del Ejemplo 6 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6919,7; valor medido: 6920.35).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35229943 a 35229962 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-TCTTCCAAGCCTTCATGTGA-OH (OA n.º 7)

El compuesto del Ejemplo 7 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6882,9; valor medido: 6883.40).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35229953 a 35229972 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-GATGGTCTTTATCTTCTCC-OH (OA n.º 8)

El compuesto del Ejemplo 8 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés. El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6889,7; valor medido: 6888.40).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35229967 a 35229986 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-GTAGAAAGTTGTTGGATGGTC-OH (OA n.º 9)

El compuesto del Ejemplo 9 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el

Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6952,7; valor medido: 6953.62).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35229980 a 35229999 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-TGCTTGATGTCAGAGTGAA-OH (OA n.º 10)

El compuesto del Ejemplo 10 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6919,7; valor medido: 6922.82).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35229994 a 35230013 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-GAAGGTCCTGCTTTCCTTCG-OH (OA n.º 11)

El compuesto del Ejemplo 11 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6914,9; valor medido: 6916.37).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35231298 a 35231317 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_018922.2).

Síntesis de HO-CCACCAAACCTGTGTTTGGA-OH (OA n.º 12)

El compuesto del Ejemplo 12 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6892,9; valor medido: 6893.44).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35208148 a 35208167 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_000011.10).

Síntesis de HO-CTGTCCAAATCTCCACCAA-OH (OA n.º 13)

El compuesto del Ejemplo 13 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de la evaporación del disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6848,99; valor medido: 6850.18).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35208161 a 35208180 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_000011.10).

Síntesis de HO-GCGTTGTCATTGAAAGAGGT -OH (OA n.º 14)

El compuesto del Ejemplo 14 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6935,72; valor medido: 6936.96).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35208187 a 35208206 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_000011.10).

Síntesis de HO-TTCCAAGCCTTCATGTGATG-OH (OA n.º 15)

El compuesto del Ejemplo 15 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6896,8; valor medido: 6896.38).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35209992 a 35210011 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_000011.10).

Síntesis de HO-GTCTCTTCTCCACCTGTGA-OH (OA n.º 16)

El compuesto del Ejemplo 16 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6887,86; valor medido: 6889.15).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35211258 a 35211277 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_000011.10).

Síntesis de HO-TTCCAGTAAAGTAGTTGAGC-OH (OA n.º 17)

El compuesto del Ejemplo 17 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6905,76; valor medido: 6907.01).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35211294 a 35211313 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_000011.10).

Síntesis de HO-TCCAAAGGACCCAGTCTTAG-OH (OA n.º 18)

El compuesto del Ejemplo 18 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6889,94; valor medido: 6891.13).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35211375 a 35211394 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_000011.10).

Síntesis de HO-GTTGGAATCTCCAACAGTAA-OH (OA n.º 19)

El compuesto del Ejemplo 19 con una secuencia de interés, se sintetizó de la misma manera que la descrita para el Compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa [(LC-8A de Shimadzu Corporation; columna (Shiseido CAPCELLPAK ODS tipo MG (de 20x250 mm)); Solución A: solución acuosa de acetato de trietilamina (TEAA) 0,1 M, pH 7,0; Solución B: acetonitrilo, % de B: del 5 % al 40 % (30 min, gradiente lineal); 40 °C; 19 ml/min; 260 nm]. Al producto purificado de esta manera se le añadió ácido acético para dar una concentración final del 10 %. La solución de reacción se dejó reposar durante la noche para eliminar los grupos DMTr. Después de destilar el disolvente, el residuo restante se disolvió en 1,0 ml de agua, se purificó con columnas NAP-10 (N.º de producto 17-0854-01 fabricado por GE Health Care) y se liofilizó para obtener así un compuesto de interés.

El compuesto en cuestión se identificó mediante MALDI-TOFMS (valor calculado: 6888,83; valor medido: 6890.14).

La secuencia de nucleótidos del compuesto en cuestión es una secuencia complementaria a la de los nucleótidos n.º 35211405 a 35211424 del ADNc de CD44 (n.º de registro del Gene Bank NC_000011.10).

[Ejemplo 2] Confirmación del efecto de la inducción de omisión de exones por oligonucleótidos antisentido (OA) en células madre cancerosas

Las siguientes células madre cancerosas de cáncer de colon y cáncer gástrico se adquirieron en la ATCC (*American Type Culture Collection*, Colección Americana de Cultivos Tipo). Estas células madre cancerosas expresan variantes exónicas del gen de CD44 (especialmente expresión de alto rendimiento de CD44v8-10).

Células HT-29 (cáncer de colon)

Células KATOIII (cáncer gástrico)

Estas células se sembraron en placas de 12 pocillos por separado y se cultivaron durante la noche. A las células KATOIII de cáncer gástrico humano así cultivadas, se añadieron los OA (50 o 100 nM). Tres horas más tarde, se añadió FBS y las células se cultivaron durante 24 horas más. Posteriormente, se recuperó el ARN, seguido de análisis

de ARNm de CD44 mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

Como resultado, se confirmó que la adición de OA inducía la omisión de exones anómalos, dando como resultado una mayor expresión de CD44 normales (figuras 7, 8 y 9); Las células KATOIII suelen expresar CD44v8-10 como una isoforma principal en la que se han insertado v8, v9 y v10, pero como resultado de la adición de OA, la expresión de CD44v8-10 disminuyó de manera dependiente de la concentración, mientras que la expresión de las CD44 se recuperó de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 80 %. La proporción de la expresión de las CD44 se determinó de la siguiente manera: los productos resultantes de la PCR, se midieron con el bioanalizador Agilent 2100 y los valores medidos se calcularon con la fórmula $CD44s/(CD44s+CD44v) \times 100$. En este caso, CD44v incluye CD44v8-10, CD44v9-10, CD44v8-9 y CD44v8.

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos con el OA n.º 7 (10 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM) que fue el más eficaz (n=3).

En la figura 11 se muestran los resultados de la figura 10 en forma de gráfico.

Se realizaron los mismos experimentos utilizando células HT-29 en lugar de células KATOIII. Como en los resultados con células KATOIII, se confirmó que se indujo la omisión de exones anómalos, dando como resultado una mayor expresión de CD44 normales. En la figura 12 (células HT-29), se muestran los resultados obtenidos con el OA n.º 7.

Extracción de ARN

El ARN se extrajo como se describe a continuación.

1. Células transfectadas con OA se cultivaron durante 24 horas y se lavaron una vez con PBS. Después, se añadieron a las células 300 µl de tampón de lisis/unión (kit de aislamiento de ARN de alta pureza, Roche) y 150 µl de PBS.
2. Después de reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto, la mezcla de células de los pocillos se recogió en tubos.
3. El ARN se extrajo de acuerdo con el protocolo del kit de aislamiento de ARN de alta pureza (Roche).
4. Finalmente, el ARN se eluyó con 36 µl de tampón de elución.

Reacción de transcripción inversa

La transcripción inversa se realizó como se describe a continuación.

1. A 500 ng de ARN, se añadió agua Milli-Q (esterilizada) para preparar una solución de 6 µl.
2. A la solución del punto 1 anterior, se añadieron 2 µl de cebadores aleatorios (Invitrogen 3 µg/µl diluidos 20 veces) y 5 µl de mezcla de dNTP 2,5 mM (Invitrogen).
3. La solución resultante se calentó a 65 °C durante 5 minutos.
4. Después, la solución se dejó reposar a 25 °C durante 10 minutos.
5. A la solución de reacción anterior, se añadió 1 µl de transcriptasa inversa del VLM-M (virus de la leucemia murina de Moloney) (Invitrogen 200 U/µl), 1 µl de RNasa OUT (Invitrogen 40 U/µl), 1 µl de DTT 0,1 M (unido a la transcriptasa inversa del VLM-M) y 4 µl de tampón stand 5xFirst (unido a la transcriptasa inversa del VLM-M).
6. La solución de reacción se mantuvo a 37 °C durante 55 minutos y después se calentó a 70 °C durante 15 minutos.
7. La solución de reacción resultante se conservó a -80 °C.

Reacción de PCR

La reacción de PCR (siglas del inglés *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa), se realizó como se describe a continuación.

1. Los componentes enumerados a continuación se mezclaron y se calentaron a 94 °C durante 3 minutos.

Productos de transcripción inversa 1,0 µl
 Cebador directo (10 pmol/µl) 0,5 µl
 Cebador inverso (10 pmol/µl) 0,5 µl
 dNTP (unido a TAKARA Ex Taq) 0,8 µl
 Tampón (unido a TAKARA Ex Taq) 1,0 µl
 Ex Taq 0,05 µl

Agua esterilizada 6,15 µl

2. Después del tratamiento a 94 °C durante 3 minutos, se realizaron 25 ciclos de tratamiento a 94 °C durante 30 segundos, a 60 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 90 minutos).
3. Después, la mezcla de reacción se calentó a 72 °C durante 3 minutos.

A continuación se muestran las secuencias de nucleótidos de los cebadores directo e inverso utilizados en la PCR para detectar una omisión de variantes exónicas.

Cebador directo (CD44 exón 5): 5'-TCCCAGACGAAGACAGTCCCTGGAT-3' (SEQ ID NO: 23)
Cebador inverso (CD44 exón 16): 5'-CACTGGGGTGAATGTGTCTTGGTC-3' (SEQ ID NO: 24)

[Ejemplo 3]

En placas de 12 pocillos, se sembraron células KATOIII a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies), se añadió el OA n.º 7 (50 nM) o agua Milli-Q (control). En una incubadora con CO₂ al 5 %, las placas se dejaron reposar durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente, se añadió IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove) que contenía FBS al 20 % (500 µl/pocillo) y CDDP (concentración final 5 µg/ml; Nippon Kayaku Co., Ltd.; Randa Inj. 10 mg/20 ml), seguido de cultivo adicional. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, y se añadió a cada pocillo el reactivo Cell Titer-Glo (Cell Titer-Glo™ de ensayo de viabilidad celular mediante luminiscencia (Promega)) preparado. Después, las señales de emisión de luciferasa se midieron con el lector de placa Multi-label (2030 ARVO X3, PerkinElmer).

Los resultados se muestran en la figura 13. El gráfico de esta figura se realizó a partir de cada uno de los valores calculados tomando el valor de control como 100 %. La adición de CDDP+OA n.º 7 inhibió el crecimiento celular en mayor grado que la adición de CDDP (cisplatino) solo.

[Ejemplo 4]

En placas de 12 pocillos, se sembraron células KATOIII a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies), se añadió el OA n.º 7 (50 nM) o el OA n.º 12 (50 nM) o agua Milli-Q (control). En una incubadora con CO₂ al 5 %, las placas se dejaron reposar durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente, se añadió IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove) que contenía FBS al 20 % (500 µl/pocillo), seguido de cultivo adicional. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, y se añadió a cada pocillo el reactivo Cell Titer-Glo (Cell Titer-Glo™ de ensayo de viabilidad celular mediante luminiscencia (Promega)) preparado. Después, las señales de emisión de luciferasa se midieron con el lector de placa Multi-label (2030 ARVO X3, Perkin-Elmer).

Los resultados se muestran en la figura 14. El OA n.º 7 fue el OA más eficaz en inducir la omisión del ARNm de CD44v (CD4v8-10), mientras que el OA n.º 12 fue el OA que apenas afectó a la omisión del ARNm de CD44v. Como control se utilizó Milli-Q (agua). El efecto tóxico del OA se confirmó comparando los resultados del OA n.º 7 y del OA n.º 12. La adición del OA n.º 7 solo inhibió el crecimiento de células KATOIII.

Aplicabilidad industrial

La presente invención es aplicable al tratamiento del cáncer.

TEXTO INDEPENDIENTE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

<SEQ ID NO: 1>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 1. 5'-actatgactggagtccatat-3'

<SEQ ID NO: 2>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 2. 5'-ttgcagtaggctgaagcggtt-3'

<SEQ ID NO: 3>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 3. 5'-caaacctgtgttggttg-3'

<SEQ ID NO: 4>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 4. 5'-aagaggtcctgtcctgtcca-3'

<SEQ ID NO: 5>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 5. 5'-gctctgagaattactctgct-3'

<SEQ ID NO: 6>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 6. 5'-cttcatgtgatgtagagaag-3'

<SEQ ID NO: 7>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 7. 5'-tctccaagccttcatgtga-3'

<SEQ ID NO: 8>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 8. 5'-gatggctttatcttcttcc-3'

<SEQ ID NO: 9>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 9. 5'-gtagaagttgttgatggc-3'

<SEQ ID NO: 10>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 10. 5'-tgctgatgcagagtagaa-3'

5 <SEQ ID NO: 11>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 11. 5'-gaaggctcgtcttccttcg-3'

<SEQ ID NO: 12>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 12. 5'-CCACCAAACCTGTGTTTGA-3'

<SEQ ID NO: 13>
10 Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 13. 5'-CTGTCCAAATCTTCCACAA-3'

<SEQ ID NO: 14>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 14. 5'-GCGTTGTCATTGAAAGAGGT-3'

<SEQ ID NO: 15>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 15. 5'-TTCCAAGCCTTCATGTGATG-3'

15 <SEQ ID NO: 16>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 16. 5'-GTCTCTTCTTCCACCTGTGA-3'

<SEQ ID NO: 17>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 17. 5'-TTCCAGTAAAGTAGTTGAGC-3'

<SEQ ID NO: 18>
20 Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 18. 5'-TCCAAAGGACCCAGTCTTAG-3'

<SEQ ID NO: 19>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del OA n.º 19. 5'-GTTGGAATCTCCAACAGTAA-3'

<SEQ ID NO: 20>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm de CD44v8.

25 atatggactccagtcagtagacaacgcttcagcctactgcaaatacaacacaggttggtggaagattggacaggacaggacctctt caatgacaacgc

<SEQ ID NO: 21>
Esta muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm de CD44v9.

agcagagtaattctcagagcttctacatcacatgaaggcttgaagaagataaagaccatccaacaacttactctgacatcaagca

<SEQ ID NO: 22>
30 Esta muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm de CD44v10.

ataggaatgatgtcacaggtggaagaagagacccaaatcattctgaaggctcaactactttactggaaggtatacctctcattaccac

acacgaaggaaagcaggacctcatccagtgacctcagtaagactgggtccttggagtactgcagttactgttgagattccaact

ctaattgtaatcgttccttatcag

<SEQ ID NO: 23>
35 Esta muestra la secuencia de nucleótidos del cebador directo utilizado en la reacción de PCR para detectar la omisión de variantes exónicas.

5'-TCCCAGACGAAGACAGTCCCTGGAT-3'

<SEQ ID NO: 24>
40 Esta muestra la secuencia de nucleótidos del cebador inverso utilizado en la reacción de PCR para detectar la omisión de variantes exónicas.

5'-CACTGGGGTGAATGTGTCTTGGTC-3'

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido capaz de inducir la omisión de una o más variantes exónicas del gen de CD44 para aumentar así la expresión de ARNm de CD44 normal, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.
2. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que mejora la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes antineoplásicos y/o a la radiación.
3. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la variante exónica diana que se va a omitir es al menos una seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10.
4. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte o a la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la variante exónica 8, 9 o 10 del gen de CD44.
5. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, que es un oligonucleótido de 20-23 bases que tiene la totalidad o una parte de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 19.
6. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos un nucleótido modificado.
7. El oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la D-ribofuranosa que constituye el nucleótido modificado está 2'-O, 4'-C-alquilada.
8. Un oligonucleótido de 20-23 bases que tiene la totalidad o una parte de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se muestran en las SEQ ID NO: 2 a 19, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo, en donde el oligonucleótido, es un oligonucleótido antisentido que se dirige a una o a más variantes exónicas del gen de CD44 y el oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de al menos una variante exónica seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10 del gen de CD44.
9. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende al menos un nucleótido modificado, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo.
10. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la D-ribofuranosa que constituye el nucleótido modificado está 2'-O, 4'-C-alquilada, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo.
11. Un fármaco para inducir la omisión de al menos una variante exónica seleccionada del grupo que consiste en las variantes exónicas 8, 9 y 10 del gen de CD44, que comprende el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo o un profármaco del mismo.
12. Una formulación que comprende el oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para administración oral o parenteral.
13. El oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para su uso como un medicamento.

Fig.1

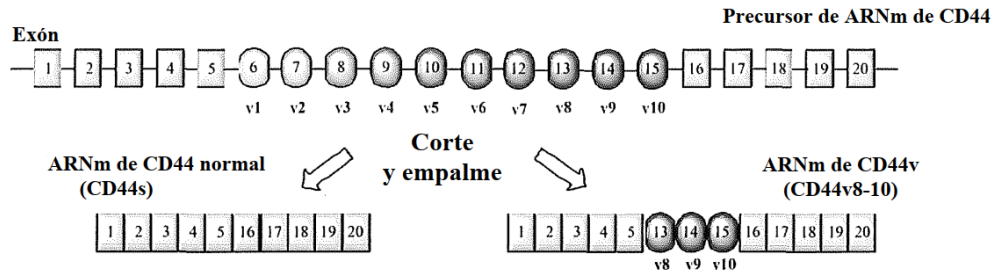


Fig.2

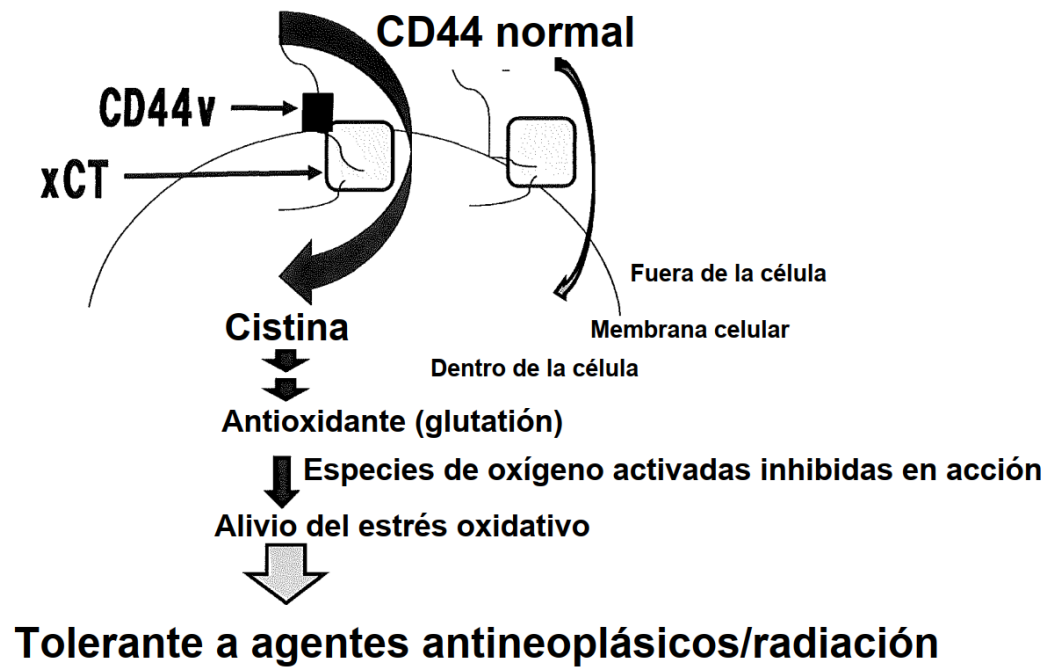


Fig. 3

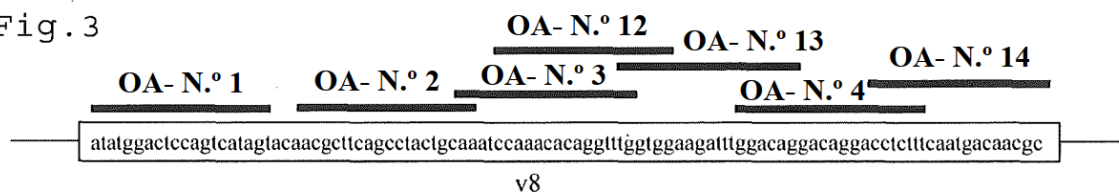


Fig. 4

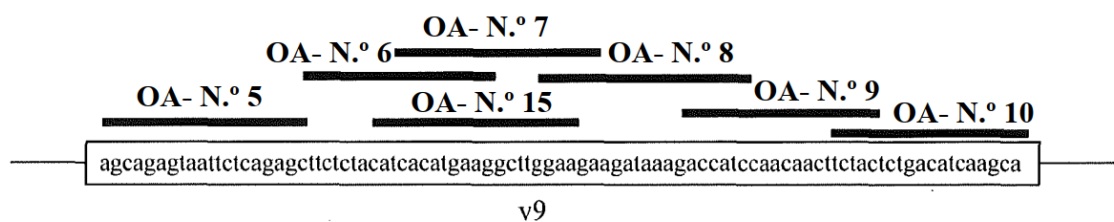


Fig. 5

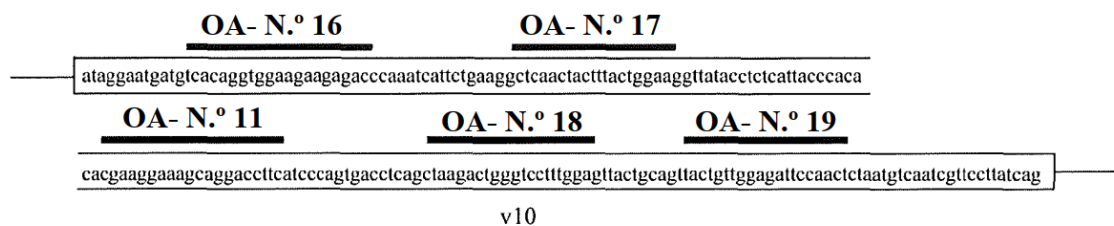


Fig. 6

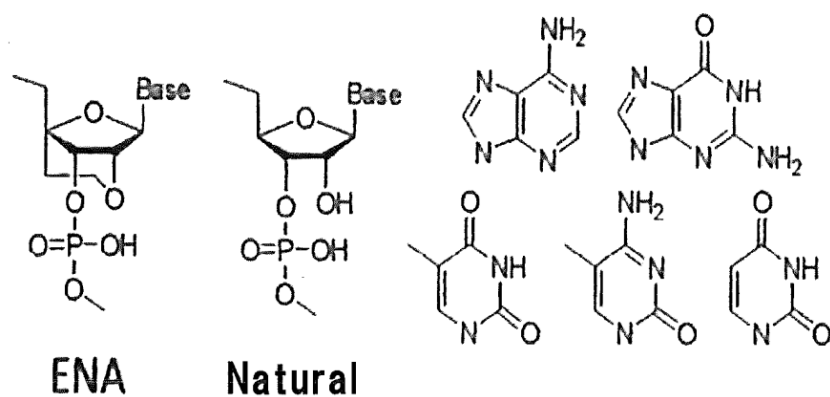


Fig. 7

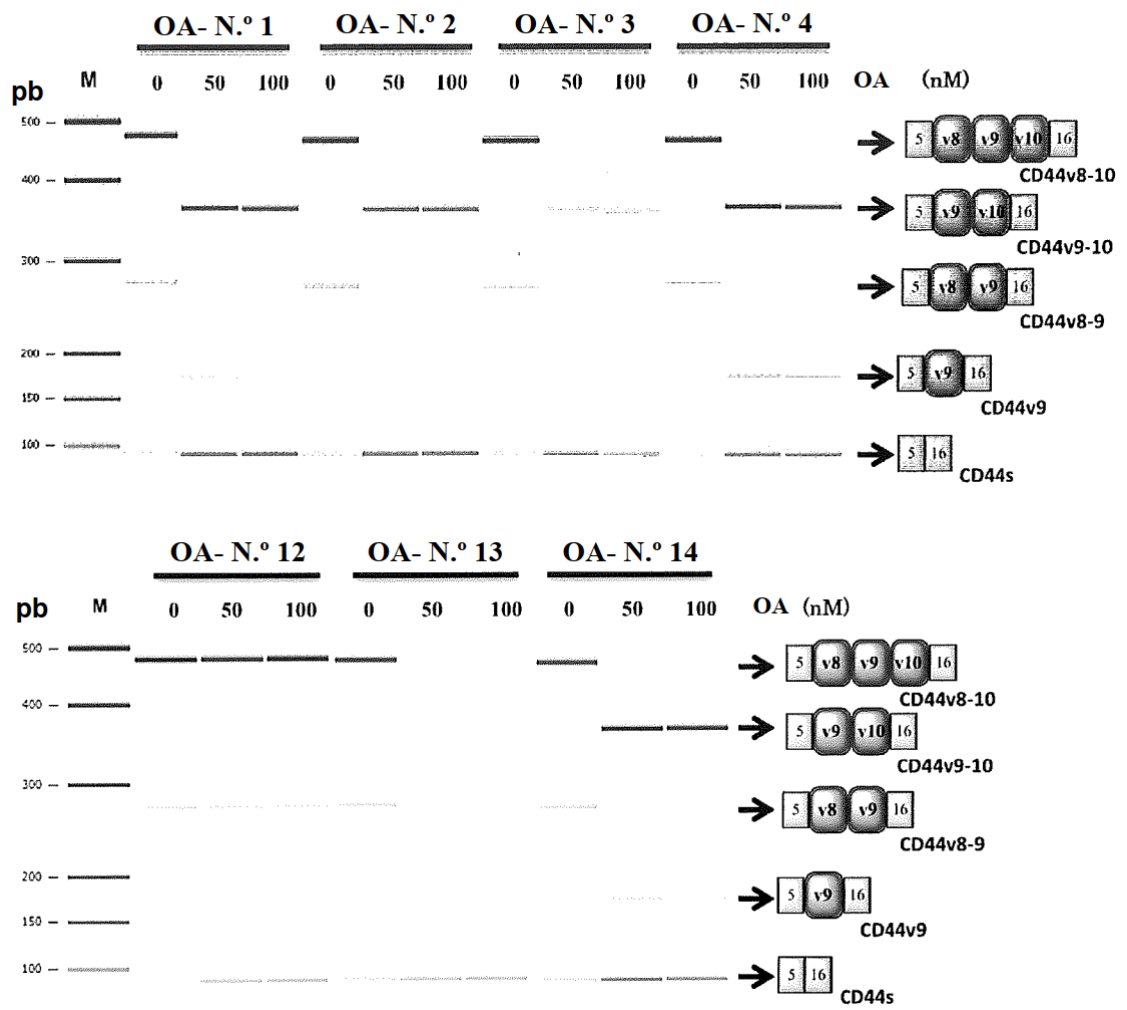


Fig. 8

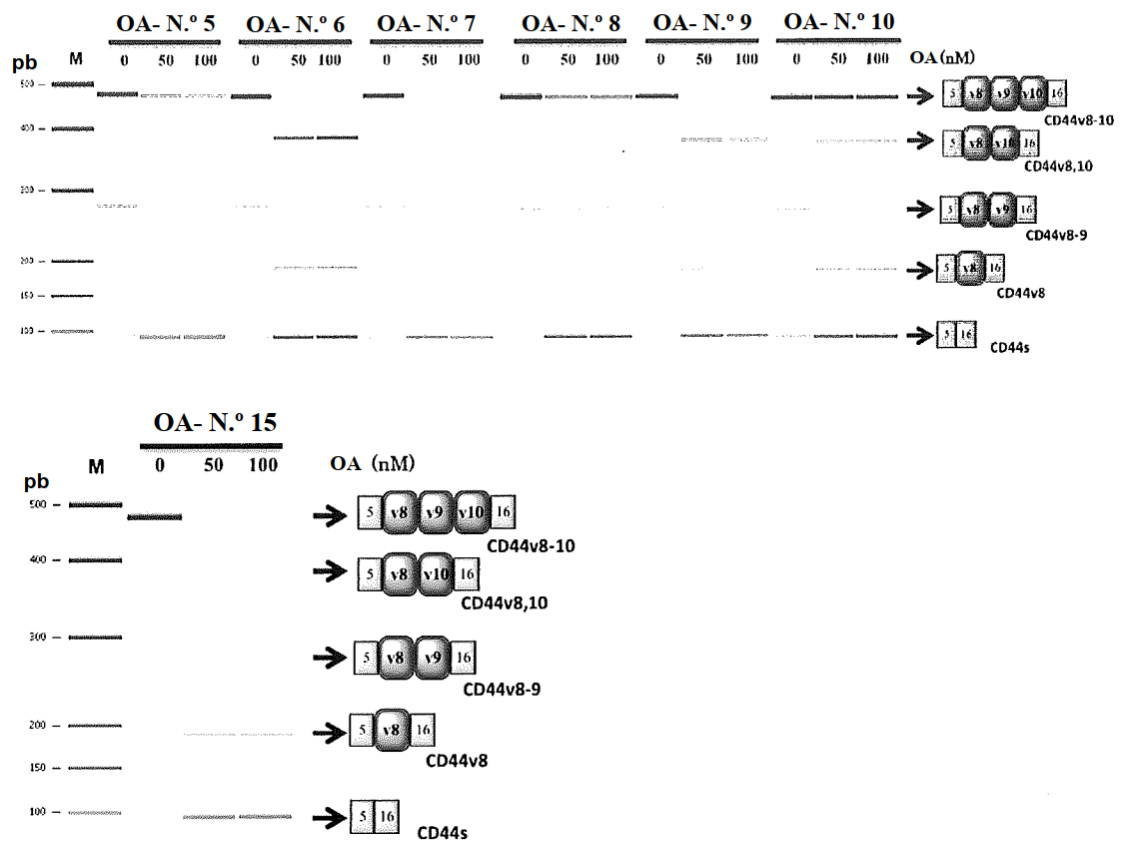


Fig. 9

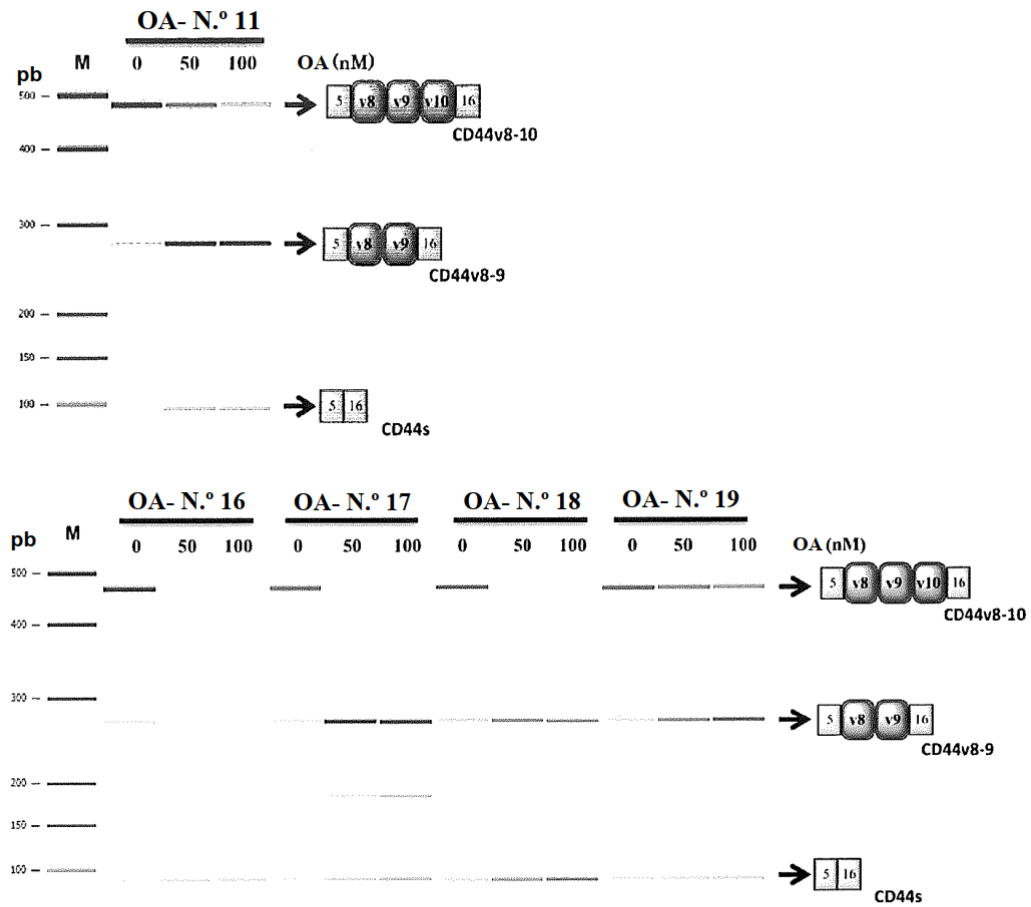


Fig.10

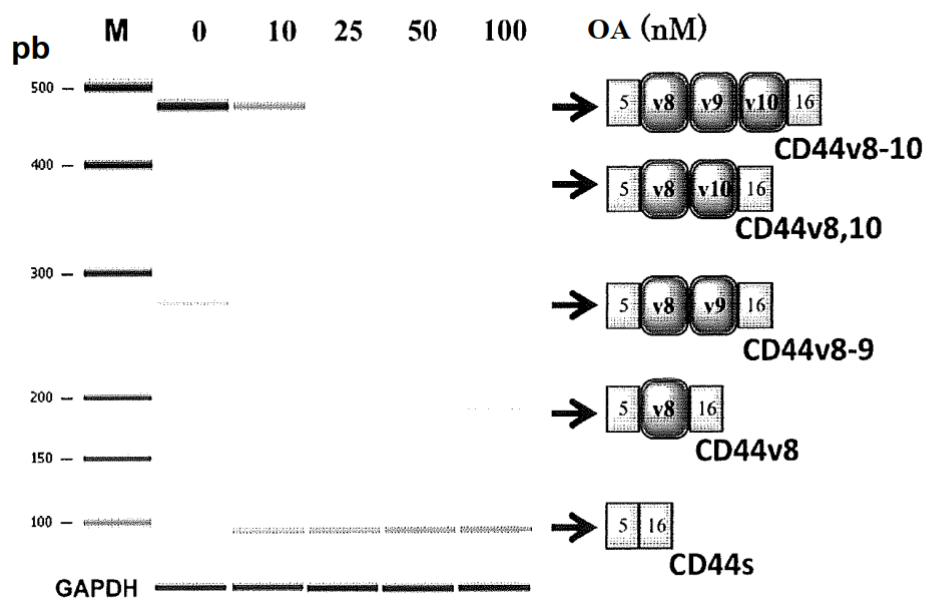


Fig. 11

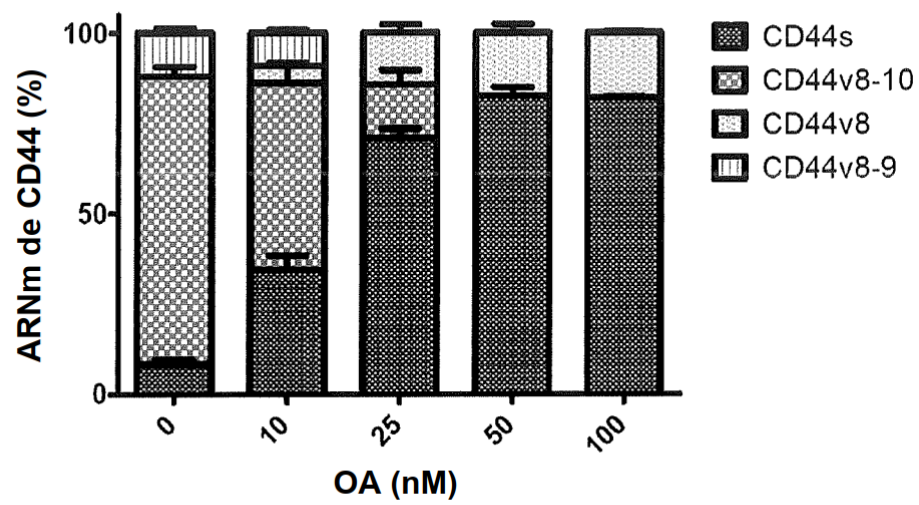


Fig. 12

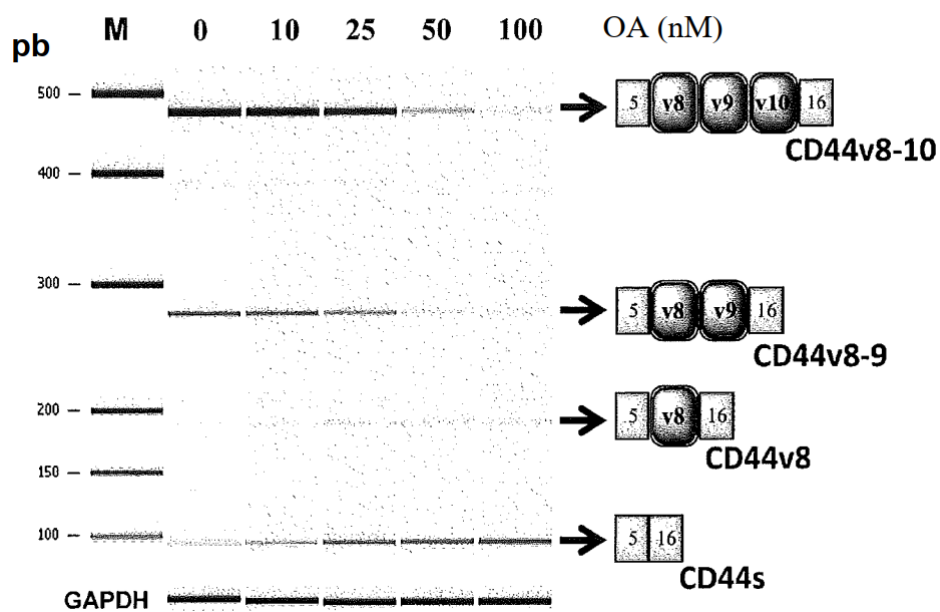


Fig.13

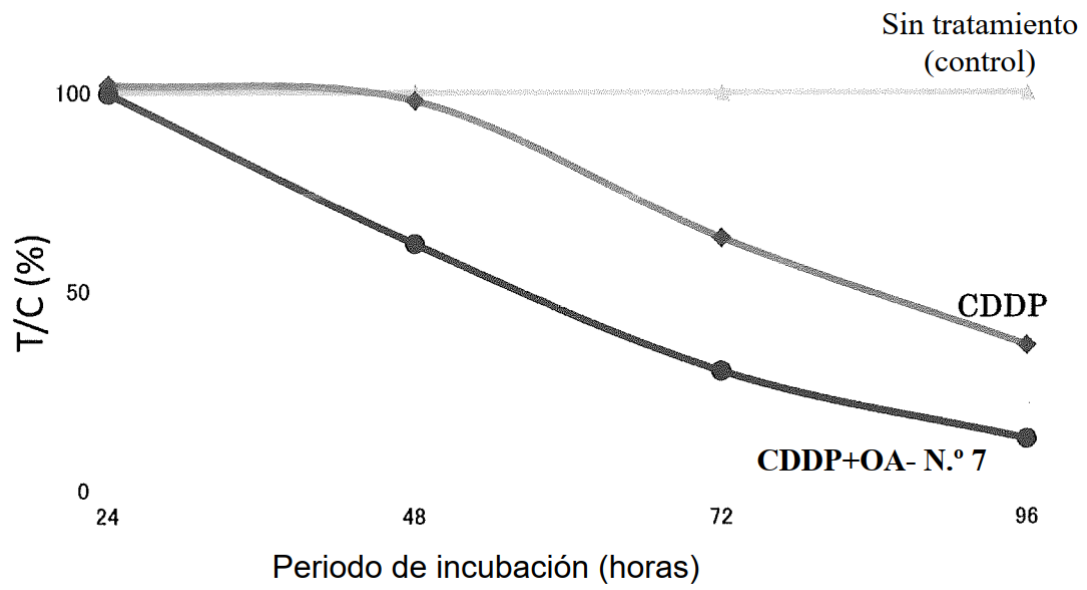


Fig.14

