



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 916**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00910916 .6**

86 Fecha de presentación : **09.03.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1175489**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.01.2002**

54

Título: **Oligonucleótidos que contienen una secuencia antisentido estabilizados mediante una estructura secundaria y composiciones farmacéuticas que los contienen.**

30

Prioridad: **09.03.1999 FR 99 02921**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73

Titular/es: **Bioalliance Pharma (S.A.)**
67, rue Vergniaud
75013 Paris, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE y
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY -IGR-

72

Inventor/es: **Malvy, Claude;**
Maksimenko, Andrei;
Helin, Valérie y
Gottikh, Marina

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 265 916 T3

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

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos que contienen una secuencia antisentido estabilizados mediante una estructura secundaria y composiciones farmacéuticas que los contienen.

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden oligonucleótidos capaces de hibridarse con una secuencia de ácido nucleico diana y que se estabilizan mediante una estructura secundaria de modo que son resistentes a la degradación por medios biológicos, principalmente a la degradación por las nucleasas.

Los ácidos nucleicos antisentido son secuencias nucleicas capaces de hibridarse selectivamente con los ARN mensajeros celulares-dianas para inhibir su traducción en proteínas. Estos oligonucleótidos forman con el ARNm diana, de manera local, regiones bicatenarias, por interacción clásica de tipo Watson-Crick.

Muchos estados patológicos son consecuencia de la expresión de un gen anormal en el interior de una célula. Tales genes extraños pueden integrarse en el ADN celular, después de una infección viral por ejemplo, y pueden por lo tanto ser expresados por la célula. Sucede lo mismo con numerosos genes oncógenos (oncogenes), que son capaces de conferir el fenotipo canceroso a una célula eucariótica, y un tumor a un organismo entero.

Uno de los enfoques propuestos en la técnica anterior para inhibir la acción de tales genes reside en la utilización de oligonucleótidos antisentido (1-3). La regulación de la expresión de genes diana por medio de oligonucleótidos antisentido constituye en efecto un enfoque terapéutico en desarrollo creciente. Este enfoque se basa en la capacidad de los oligonucleótidos de hibridarse específicamente en las regiones complementarias de un ácido nucleico, y de inhibir también específicamente la expresión de genes determinados. Esta inhibición puede ocurrir ya sea en el nivel de la traducción (oligonucleótido antisentido) o bien en el nivel transcripcional (oligonucleótido anti-gen).

La aplicación terapéutica de una tecnología antisentido ha sido ampliamente estudiada en numerosas infecciones virales, incluyendo el virus de la inmunodeficiencia adquirida (4), el virus de la gripe (5), el virus de Epstein-Barr (6), los papilomavirus humanos (7,8) y los virus simplex del herpes (9,10).

Puede tratarse por ejemplo de oligonucleótidos sintéticos, de pequeño tamaño, complementarios de ARNm celulares y que se introducen en las células dianas. Se han descrito tales oligonucleótidos por ejemplo en la solicitud de patente europea n° 92574. Puede igualmente tratarse de genes antisentido cuya expresión en la célula diana genera ARNm complementarios a los ARNm celulares. Se han descrito tales genes por ejemplo en la solicitud de patente europea n° 140308.

Sin embargo la utilización *in vivo* de ácidos nucleicos antisentido se enfrenta a un cierto número de dificultades que limitan hasta hoy su explotación terapéutica.

En efecto, los ácidos nucleicos presentan una gran sensibilidad a la degradación por las enzimas del organismo, tales como las nucleasas (11,12), lo que implica el uso de dosis importantes. Además, tienen una débil penetración en ciertos tipos celulares y una distribución intracelular a menudo inadecuada, lo que les deja sin efecto terapéutico. Por último, es importante poder disponer de secuencias suficientemente selectivas y estables para obtener un efecto específico sin alterar otras funciones celulares.

Después de los primeros intentos por Stephenson y Zamecnik (13) para inhibir el virus del sarcoma de Rous utilizando oligonucleótidos fosfodiésteres, se han realizado numerosos esfuerzos para optimizar la eficacia de estos oligonucleótidos, particularmente sobre la penetración celular (14-16), la fijación a su diana (17), la resistencia a las nucleasas (18-20).

El problema de la resistencia de los oligonucleótidos a las nucleasas permanece como un problema limitante de las posibilidades de desarrollo de esta estrategia terapéutica. Para tratar de resolver el problema, se ha propuesto en la técnica anterior modificar clínicamente el esqueleto fosfodiéster de los ácidos nucleicos para dar lugar a nuevas clases de oligonucleótidos artificiales (21-23). Entre éstos, se puede citar los oligonucleótidos, fosfonatos, fosforamidatos y fosforotioatos que se han descrito por ejemplo en la solicitud de patente internacional PCT n° WO94/08003, donde los oligonucleótidos se acoplan a diferentes agentes tales como colesterol, un péptido, un polímero catiónico, etc.

Sin embargo, si bien algunos de estos oligonucleótidos modificados presentan una buena resistencia a las nucleasas, estas modificaciones pueden presentar el inconveniente de estar acompañadas por la pérdida de otras propiedades importantes para la actividad antisentido, tales como su afinidad por las dianas de ARNm, su capacidad de modular la degradación de los ARN por las ARNasas y su poder de penetración y de distribución en los diferentes compartimientos celulares resulta muy débil (1,22,24). Además, su actividad biológica no está siempre aumentada y pueden presentar ciertos efectos secundarios ligados a la preferencia de restos no naturales en su estructura. En efecto, los oligonucleótidos así modificados presentan características indeseables como las interacciones no específicas con las proteínas celulares, y una gran citotoxicidad (25-29).

Otro procedimiento que permite incrementar la resistencia de los oligonucleótidos a las nucleasas, pero utilizando fosfodiésteres naturales, consiste en injertar en el extremo 3' de la secuencia que se va a proteger un conjugado de dodecanol (solicitudes de patente europea n° EP 117777 y EP 169787).

Para paliar los inconvenientes expuestos anteriormente, se ha propuesto también en la técnica anterior, por ejemplo en la solicitud de parte internacional PCT nº WO 94/12633, unir a uno y/u otro de los extremos de la secuencia antisentido a proteger las secuencias nucleotídicas cuya estructura secundaria se presenta bajo la forma de bucles o de horquillas, capaces de impedir a las nucleasas que degraden la secuencia antisentido (30-35). Ahora bien, esta técnica no es satisfactoria puesto que la presencia de nucleótidos suplementarios a las secuencias en horquilla estorba la hibridación de la secuencia antisentido con los ácidos nucleicos dianas.

La presente invención apunta precisamente a ofrecer nuevos oligonucleótidos capaces de modificar o de inhibir la expresión de genes *in vivo* o *in vitro* y resistentes a la digestión por nucleasas sin presentar los inconvenientes descritos anteriormente.

La invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento del sarcoma de Ewing, caracterizado porque comprende como principio activo al menos uno de los oligonucleótidos representados en la lista de secuencia bajo los números SEQ ID NO.1 o SEQ ID NO.2.

La invención se refiere igualmente a composiciones farmacéuticas que contienen uno o varios oligonucleótidos descritos anteriormente idénticos o diferentes asociados en dicha composición a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser libres, encapsulados, acoplados, conjugados con sustancias diversas como anticuerpos, proteínas, liposomas, microesferas, microorganismos o células adaptadas a los modos de administración utilizados, o cualquier otro tipo de vector como nanopartículas, dendrímeros, lípidos catiónicos o péptidos.

Otras ventajas y características de la invención aparecerán en los Ejemplos que siguen y las Figuras 1 a 6 que representan esquemáticamente los ejemplos de realización de los oligonucleótidos de la invención. En las figuras, los trazos gruesos simbolizan la secuencia antisentido, los trazos finos simbolizan la o las secuencias suplementarias, si está(n) presente(s), y las barras horizontales simbolizan los enlaces del par de bases.

Ejemplo 1

Estudio de oligonucleótidos antisentido de la invención que comprenden una región complementaria de la región de iniciación de la traducción del ARN env del retrovirus de la leucemia murina de Friend

Se hará referencia en este ejemplo a los dibujos anexos, entre los cuales:

- La figura 7 representa los oligonucleótidos utilizados en la parte experimental siguiente. Las secuencias dianas de ADN y de ARN de 21 meros están subrayadas. Las secuencias de los oligodesoxirribonucleótidos antisentido complementarios de las dianas D y R están en caracteres en negrita.

- La figura 8 representa el análisis electroforético de la formación de dúplex en PAGE natural al 15% a 37°C. En A: Fijación de la diana de ARNm marcada con ³²P (pista 1) en los oligodesoxinucleótidos 21L (pista 2), 21PS (pista 3), H6 (pista 4), H8 (pista 5), H0 (pista 6), Dh6 (pista 7), L8 (pista 8), L10 (pista 9), SL (pista 10), 55L (pista 11). En B: Fijación de la diana de ADN marcado con ³²P (pista 1) en los oligodesoxinucleótidos 21L (pista 2), 21PS (pista 3), H6 (pista 4), H8 (pista 5), H0 (pista 6), Dh6 (pista 7), L8 (pista 8), L10 (pista 9), SL (pista 10), 55L (pista 11).

- La figura 9 representa la escisión de la diana de ARN por la Rnasa H en presencia de los oligonucleótidos antisentido 21L (pista 2), 21PS (pista 3), H6 (pista 4), H8 (pista 5), H0 (pista 6), Dh6 (pista 7), L8 (pista 8), L10 (pista 9), SL (pista 10), 55L (pista 11). ARN R marcado con ³²P, solo (pista 1) y en presencia de Rnasa H sin ODNs (pista 12). Las flechas indican los sitios mayores de escisión.

- La figura 10 representa la degradación de los oligonucleótidos antisentido en DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado por calor, en ausencia (a, b) y en presencia (c, d) de SuperFect™.

- La figura 11 representa la degradación de los oligonucleótidos antisentido en los lisados celulares: (a, b) lisado HeLa, (c, d) lisado NIH 3T3.

- La figura 12 representa la degradación de oligonucleótidos antisentido complejos con SuperFect™ en el interior de las células: (a, b) HeLa, (c, d) NIH 3T3.

I- Materiales y métodos

1) Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos han sido adquiridos en la Société Eurogentec (Seraing, Bélgica), a continuación desalificados en columnas Sephadex G25 y cuantificados por absorbancia a 260 nm.

2) Protección del extremo 5' fosfato de los oligonucleótidos antisentido

El marcado en el extremo 5' de los oligonucleótidos se ha realizado utilizando ATP(³²P-γ) (Amersham) y T4 polinucleótido-quinasa (Promega). Los oligonucleótidos marcados se purificaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizada al 20%, luego se disolvieron disueltos en 100 μl de tampón de N-metilmorfina 1M (pH 7,5), MgCl₂ 20 mM, que contenía 50% de etanol y la solución se suplementó con 10 mg de 1-etil-3(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida. La reacción se realizó durante 16 horas a 4°C y los oligonucleótidos se precipitaron dos veces con 1 ml de una solución de LiClO₄ al 2% en acetona y se lavaron con acetona. Estos oligonucleótidos que tenían el fosfato terminal protegido por un residuo etilo contra la hidrólisis por una fosfatasa se mezclaron a continuación con oligodesoxinucleótidos (ODN) no marcados y utilizados para estudiar su resistencia a una digestión enzimática.

3) Experiencias de desnaturalización térmica

Las curvas de absorbancia/temperatura se registraron a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Uvikon 933 equipado con un termoprogramador. Las soluciones de ODN se prepararon en 600 μl de un tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5) con NaCl 50 mM. La concentración de cada cadena de oligonucleótido es 10⁻⁶ M. La absorbancia se midió mientras se elevaba la temperatura desde 20°C hasta 80°C a razón de 0,5°C por minuto. Las temperaturas de fusión (T_m) se determinaron mediante ajuste informático a partir de la derivada primera de la absorbancia según 1/T. La precisión de T_n se estimó en ± 0,5°C a partir de repeticiones de las experiencias. Los valores de la energía libre para la disociación del dúplex se derivaron mediante ajuste informático de las curvas de fusión utilizando el modelo de dos estados (36).

4) Gel de electroforesis natural

Las matrices de ARN y ADN (R y D) se marcaron utilizando ATP(³²P-γ) y la polinucleótido-quinasa de T4. Los oligonucleótidos (10 pmoles por cada cadena) se disolvieron en 10 μl de tampón Tris-acetato (pH 7,5), CH₃COONa 150 mM, MgCl₂ 2 mM, y se incubaron a 37°C durante 1 hora y a continuación se suplementaron con 1 μl de una solución al 70% de glicerol que contenía cianol-xileno y azul de bromofenol. Las electroforesis se realizaron en un gel de acrilamida al 15% no desnaturalizada (19:1 acrilamida/bis-acrilamida) en el mismo tampón Tris-acetato a 37°C durante 24 horas (9 V/cm).

5) Escisión por Rnasa-H

Con el fin de estudiar la activación de la actividad Rnasa H para los ODN, 10 pmoles de los mismos se mezclaron con 1 pmol de la matriz de ARN (R) marcado en 5' con (³²P) en 10 μl de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM; KCl 100 mM, DTT 0,1 mM en presencia de 0,5 μl de RNasin (Gibco BRL) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 0,5 U de Rnasa H de *E. coli* (Promega, Madison, WI) y las mezclas se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Las muestras se precipitaron con acetona que contenía LiClO₄ al 2%, se secaron, se disolvieron en 4 μl de formamida:agua (4:1), 0,01% de azul de bromofenol y 0,01% de cianol-xileno y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% desnaturalizada seguida de una autorradiografía.

6) Células y medios

Se cultivaron líneas celulares NIH 3T3 y HeLa en un medio DMEM suplementado con respectivamente 5% y 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor (Gibco, BRL), estreptomycin (100 mg/μl) y penicilina (100 U/ml). Todas las células se incubaron a 37°C en CO₂ al 5%.

7) Preparación de lisados de células

Las células NIH 3T3 y HeLa se lavaron tres veces con PBS, después se pusieron en 1 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, 1% de NP-40, 02 mg/ml de metilsulfonilfluoruro de fenilo (PMSF) y se conservaron a -20°C durante 30 minutos. Tras la descongelación, las células se centrifugaron a 14000 g durante 15 minutos a 4°C. El líquido sobrenadante se utilizó para estudiar la degradación enzimática de los oligonucleótidos. La concentración de proteína en cada lisado se cuantificó para utilizar la BSA como patrón(37).

8) Estudio de la degradación de oligonucleótido en un medio biológico

La determinación de la tasa de degradación de oligonucleótido se efectuó en DMEM que contenía 10% de FBS inactivado por calor (56°C durante 30 minutos) y en los lisados de células. Los lisados se diluyeron en un tampón de fosfato de fosfato 10 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM con el fin de disponer de la misma concentración total de proteína de 1,22 mg/ml. Para evitar la escisión enzimática del fosfato marcado con ³²P, se utilizaron oligonucleótidos con el fosfato terminal protegido preparados como se ha descrito anteriormente. Los ODN marcados con ³²P a una concentración de 10 μM se incubaron en 120 μl de medio correspondiente a 37°C. A diferentes tiempos, se extrajeron partes alícuotas de 15 μl, suplementadas con 15 μl de EDTA 50 mM y congeladas a -20°C. Las muestras se extrajeron dos veces con una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1). Los oligonucleótidos se precipitaron en fracciones acuosas por 10 volúmenes de acetona que contenía 2% de LiClO₄, se secaron y se disolvieron en 5 μl de una mezcla formamida/agua (4/1), 0,01% de azul de bromofenol y 0,01% de

cianol-xileno. Las muestras se analizaron por electroforesis sobre un gel de poliacrilamida al 20% desnaturalizada. Los geles obtenidos se escanearon utilizando un dispositivo de imagen fosforescente (Storm 840, Molecular Dynamics). La degradación de los oligonucleótidos se cuantificó como la relación de la señal eficaz de las bandas correspondientes a los oligonucleótidos intactos y degradados. La precisión del porcentaje de degradación se estimó en $\pm 0,5\%$ sobre la base de repeticiones de las experiencias.

9) Estudio de la degradación de oligonucleótido en la célula

Un día antes, las células habían sido sembradas sobre una placa de 6 pocillos para obtener 60-80% de confluencia (4×10^5 células). Se mezclaron $5 \mu\text{g}$ de cada ODN con $6 \mu\text{l}$ de SuperFect™ (Quiagen, Canadá) en un volumen final de $150 \mu\text{l}$ de DMEM (sin FBS y antibiótico) durante 10 minutos a la temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS, las mezclas de SuperFect™-ODN se diluyeron con $850 \mu\text{l}$ de 10% (para las células HeLa) o 5% (para las células NIH 3T3) FBS DMEM (con antibióticos) y se añadieron a las células.

El líquido sobrenadante se extrajo después de 16 ó 48 horas, y se cosecharon las células para un tratamiento con tripsina. Después, las células se lavaron tres veces con PBS, se suspendieron en $500 \mu\text{l}$ de tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 20 mM, 1% de NP-40 y se dejaron 30 minutos a -20°C . Tras la descongelación, las células se calentaron 30 minutos a 90°C con el fin de destruir completamente todos los compartimentos celulares y se extrajeron dos veces con una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1). Los ODN se precipitaron en fracciones acuosas que contenían 0,5 M de acetato de sodio añadiendo etanol 5 veces en exceso, se disolvieron en una mezcla de formamida/agua (4/1), 0,01% de azul de bromofenol y 0,01% de cianol-xileno y se analizaron por electroforesis sobre gel desnaturalizado al 20%. Los geles obtenidos se escanearon utilizando un dispositivo de imagen fosforescente (Storm 840, Molecular Dynamics) La degradación de los oligonucleótidos se cuantificó como la relación de la señal eficaz de las bandas correspondientes a los oligonucleótidos intactos y degradados.

II- Resultados

1) Estructuras de los oligonucleótidos estructurados

Como se muestra en la figura 7, todos los oligodesoxirribonucleótidos estudiados comprenden la secuencia de 21 bases 5'-TGAACACGCCATGTCGATTCT-3' subrayada o indicada en negrita en la figura 7, complementaria de la región de iniciación de la traducción del ARN env del retrovirus de la leucemia murina de Friend. Los oligonucleótidos 21L y 55L tienen una estructura lineal como el oligonucleótido 21PS. Sin embargo, este último contiene dos grupos fosforilados en cada extremo para protegerle de la degradación enzimática. Los oligonucleótidos H6, H8 y H10 presentan un número diferente de pares de bases (pb) en la secuencia suplementaria de la estructura secundaria en horquilla localizada en el extremo 3'. DH6 puede formar una estructura secundaria en horquilla con colas de 6 pb en los extremos 5' y 3'. L8 y L10 pueden formar estructuras secundarias en bucles con 13 nucleótidos situados en el bucle y en las colas con respectivamente 8 y 10 pb.

2) Estudio de las propiedades de unión de los oligonucleótidos

La Tabla 1 siguiente muestra la temperatura de fusión (T_m) y el ΔG_{37}° determinados a la vez para los oligonucleótidos (ON) solos y para los complejos con las dianas de ADN (D) ó ARN (R), en fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH = 7,5.

TABLA 1

ON + diana	$T_m(^{\circ}\text{C})^{(a)}$	$-\Delta H^{(b)}$ (kcal.mol $^{-1}$)	$-\Delta S(\text{e.u.})^{(c)}$	$-\Delta G_{37}^U$ (kcal.mol $^{-1}$)
21L + D	60	101	267	18,2
21L + R	57	105	286	16,3
21PS + D	60	82	215	15,4
21PS + R	57	86	232	14,1
H6	52	45	139	1,9
H6 + D	58	92	249	14,8
H6 + R	56	82	222	13,2
H8	66	62	190	3,1
H8 + D	60	60	151	13,2
H8 + R	56	52	130	11,7

ES 2 265 916 T3

TABLA 1 (continuación)

	ON + diana	$T_m(^{\circ}\text{C})^{(a)}$	$-\Delta H^{(b)}$ (kcal.mol ⁻¹)	$-\Delta S(\text{e.u.})^{(c)}$	$-\Delta G_{37}^U$ (kcal.mol ⁻¹)
5	H10	75	44	128	4,3
	H10 + D	43,60,73	43	102	11,4
	H10 + R	40,57,73	35	78	10,8
10	Dh6	52	35	104	2,8
	Dh6 + R	57	90	245	14,1
	+ R	55	80	218	12,4
15	L8	47	46	142	2,0
	L8 + D	60	96	260	15,4
	L8 + R	57	101	280	14,2
20	L10	53	68	208	3,5
	L10 + D	57	94	255	15,0
	L10 + R	55	96	265	13,9
25	ΔH , ΔS y ΔG son las medias de varios valores obtenidos de curvas de fusión independientes y están redondeadas. (a): el error en las T_m es $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. (b): el error en las ΔH es ± 5 kcal.mol ⁻¹ . (c): el error en las ΔS es ± 10 e.u.				

Los dominios bicatenarios de los ODN que poseen una estructura secundaria, también denominados (SODN) han sido hallados estables en condiciones sensiblemente fisiológicas. La estabilidad térmica de los dúplex internos en los ODN H6, H8, H10 y L8 y L10 depende del número de pares de bases en su región de cola. No obstante, como se muestra en la Tabla 1, todos los SODN son capaces de interactuar a la vez con las dianas de ADN y de ARN para formar dúplex intermoleculares que poseen parámetros termodinámicos diferentes de los dúplex intramoleculares. El T_m hallado para estos dúplex bimoleculares difiere significativamente de la T_m de los SODN y corresponde aproximadamente a la T_m detectada para los dúplex formados por el ODN lineal 21 L con las dos dianas. La única excepción es el oligonucleótido H10, que presenta una horquilla muy estable ($T_m = 75^{\circ}\text{C}$). En presencia de dianas D ó R, la curva de fusión presenta tres fases:

- la primera corresponde a la fusión de un dúplex intermolecular parcial formado entre el fragmento de cadena sencilla de 11 meros de este ODN y la diana (43°C con la diana de ADN y 40°C con la diana de ARN),
- la segunda corresponde a la fusión del dúplex intermolecular completo (60°C con la diana de ADN y 57°C con la diana de ARN),
- la tercera corresponde la fusión de su propio dominio en doble hélice (73°C).

La fijación de los SODN con las dianas de ADN y de ARN también se estudió mediante un ensayo de movilidad sobre gel. Los ODN se incubaron con las dianas D y R marcadas con (³²P) a 37°C y la movilidad de los complejos formados se determinó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizada al 15%. La figura 8 muestra que la movilidad electroforética de las dos dianas cambia en presencia de todos los SODN de acuerdo a su implicación en la formación de los complejos correspondientes.

También se estudió la capacidad de los SODN de hibridarse con la cadena de ARN complementaria y desencadenar el corte por la Rnasa H. La figura 9 muestra el resultado de la incubación de la diana de ARN (0,1 pM) y de diferentes ODN con 0,5 unidades de Rnasa H durante 15 minutos a 37°C . El corte del ARN (R) por la Rnasa en presencia del oligonucleótido lineal 21L y de todos los SODN intervienen con la misma eficacia y en los mismos sitios. Los sitios principales de corte están indicados por flechas en la figura 9. En ausencia de ODN complementarios no se ha observado ningún corte del ARN.

Todos estos resultados muestran que la estructura bicatenaria interna de los ODN no impide su interacción con sus dianas de ADN o de ARN. Los dúplex internos parecen disociarse cuando se forman los complejos bimoleculares entre los SODN y sus dianas, evidentemente, como se muestra en la Tabla 1, los dúplex bimoleculares son preferidos termodinámicamente.

3) Estabilidad de los oligonucleótidos antisentido con respecto a la degradación nucleolítica

La capacidad de los ODN con una estructura secundaria para resistir la hidrólisis enzimática se ha estudiado en DMEM suplementado con FBS al 10% inactivado por calor, generalmente utilizado para el cultivo de células, así como en los lisados celulares de dos tipos de líneas celulares (NIH 3T3 y HeLa). Con el fin de evitar la escisión del fosfato marcado con (^{32}P) se han utilizado en este estudio oligonucleótidos con un fosfato protegido en 5' por un residuo etilo.

Las figuras 10 (a) y (b) que se refieren al análisis de la degradación del ODN en el medio de cultivo con FBS demuestran que la estructura secundaria, en horquilla, en bucle o en espiral aumenta significativamente la resistencia a las nucleasas de los SODN. La resistencia de los ODN con la horquilla y el bucle a la degradación depende del tipo de dúplex internos de su estabilidad térmica. Por ejemplo, la semivida de la horquilla más termoestable H10 es superior a la de las horquillas H6 y H8. En tiempos iguales, el ODN L10 con un bucle es tan resistente a la degradación como la H8 con una horquilla mientras que su estabilidad térmica es inferior (53°C para L10 y 60°C para H8). Todos los oligonucleótidos lineales 21L, 55L y 21PS se degradan rápidamente. Estos resultados confirman los datos expuestos anteriormente sobre la semivida muy corta de los oligonucleótidos fosforotioatos y fosfodiésteres lineales en el suero (10,11).

Con el fin de aumentar la penetración de oligonucleótidos en las células se pueden utilizar varios reactivos de transfección (38-42). Se ha estudiado la influencia de uno entre ellos, una molécula dendrímica denominada SuperFect™, sobre la estabilidad del ODN en el DMEM suplementado con FBS al 10%. Como se muestra en la figura 10 (c) y (d), las formas complejas de los ODN con SuperFect™ presentan una resistencia más fuerte a la degradación nucleolítica que los ODN solos. El aumento de la resistencia más significativo es con los ODN lineales 55L y 21PS. Por ejemplo, la semivida de fosforotioato 21PS con y sin SuperFect™ es respectivamente de alrededor de 12 horas a 30 minutos. Se ha observado el mismo aumento de la estabilidad con el 55L como se muestra en la figura 10 (a) y (c). Esto está de acuerdo con los datos conocidos en la bibliografía que muestran que la formación de complejos de compuestos poliamínicos con los ODN aumenta su estabilidad con respecto a las nucleasas (38). Por otra parte, la semivida del ODN no modificado 21L con y sin SuperFect™ es casi idéntica. Es posible que el complejo formado por el SuperFect™ con este ODN corto no protege suficientemente los extremos del oligonucleótido que sufre las degradaciones enzimáticas.

La estabilidad de los ODN en los lisados de células HeLa y NIH 3T3 varía con el tipo de lisado. Conviene señalar que la concentración de proteína en estos lisados es idéntica. En consecuencia, las distinciones entre sus actividades nucleolíticas dependen de la diferencia cuantitativa o cualitativa de la actividad de las nucleasas. La figura 11 (a) y (b) muestra que la degradación es más rápida en el lisado HeLa. Todos los ODN lineales, 21L, 21PS y 55L, se degradan rápidamente, siendo su semivida de alrededor de 10 minutos.

En lo que respecta al lisado NIH 3T3, la figura 11 (c) y (d) muestra que la tasa de degradación de los SODN es más débil que en el lisado HeLa. Resulta interesante que los SODN Dh6, L8 y L10, todos ellos con una protección 5' y 3', son más estables que los SODN H6 a H10 que tienen solamente una horquilla en el extremo 3'. Estos resultados sugieren que la contribución de la actividad exonucleásica 5' sobre la degradación del ODN es muy importante en este lisado. De cualquier modo, la modificación por un fosforotioato terminal no tiene una influencia significativa sobre la resistencia del ODN, en cuanto a los ODN 21L y 21PS.

La figura 12 muestra el comportamiento de los ODN en las dos líneas celulares HeLa y 3T3. Para mejorar la penetración de los ODN en las células, se han formado complejos con el agente de transfección TransFect™ y se han incubado con las células. La figura 12 (b) y (d) muestra que solamente se han encontrado trazas de 21L en los dos tipos celulares después de 16 horas de incubación. Por el contrario, la figura 12 (a) a (d) muestra que se han detectado cantidades significativas (50 a 80%) de otros ODN incluyendo los lineales (55L y 21PS) en las células. Después de 48 horas de incubación, la cantidad de ODN intacto en el interior de las células disminuyó pero permaneció en un nivel del 20 al 30%. La figura 12 (a), (b) y (c), (d) muestra que no hay diferencia significativa entre las dos líneas celulares. Todos los ODN con una estructura secundaria tienen la misma estabilidad, que es superior a la estabilidad de los ODN lineales 55L y 21PS.

Ejemplo 2

Inhibición de la expresión proteica del gen informador pEGFP-N1

Este ejemplo muestra los resultados del ensayo β -gal/pEGFP-N1 en células HeLa.

La tabla 2 siguiente indica las características de los oligonucleótidos utilizados en este ejemplo y cuyas secuencias se muestran en la figura 13 en el anexo.

ES 2 265 916 T3

TABLA 2

5	Oligonucleótido	T _m , °C, NaCl 50 mM, fosfato 10 mM (pH 7,0)	T _m , °C, NaCl 150 mM, MgCl ₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,0)	Estructura posible a 37°C
	Dh INGFP	60	71	Horquilla
	Sh-6 INGFP	56	68	Horquilla
10	L2 INGFP	50	56	Hélice-bucle
	L2 INGFP	48	56	Hélice-bucle
15	L4 INGFP	55	63	Hélice-bucle
	Dh INGFP	32,45	58	Horquilla
	L4 INGFP	56	64	Hélice-bucle
20	L7 INGFP	52	60	Hélice-bucle
	C7 INGFP	50	57	Hélice-bucle
25	21 PS	-	30	Lineal

El presente ejemplo relaciona igualmente los resultados obtenidos al introducir en tres oligonucleótidos antisentido de la invención los nucleótidos fosforotiatos marcados con * en la figura 13.

La tabla 3 siguiente muestra la inhibición de la expresión proteica del gen informador pEGFP-N1 (en %) por los oligonucleótidos fosfodiésteres y fosforotioatos.

TABLA 3

35	Oligonucleótidos fosfodiésteres (%)		Oligonucleótidos fosforotioatos (%)	
	Dh INGFP	15-25		
40	Sh-6 INGFP	15-25		
	L2 INGFP	5-10	2 INGFP	65-80
45	L4 INGFP	15-25	L4 INGFP	30-40
	L7 INGFP	10-15		
	C7 INGFP (control negativo)	0	21 PS (control negativo)	0
50			Dh INGFP	15-30

Ejemplo 3

Estudio de oligonucleótidos antisentido de la invención que comprenden una región complementaria del oncogén EWS-Fli1 del sarcoma de Ewing

1) Selección de los oligonucleótidos antisentido según la invención

EWS-Fli1 es el oncogén del sarcoma de Ewing (tumor sólido y hematológico infantil) y de tumores primitivos neuroectodermales.

Para inhibir el gen *EWS-Fli1*, se ha elegido el ARN en tanto que diana, puesto que produce una proteína quimérica EWS-Fli1. Esta proteína, responsable de la enfermedad, provoca el desarrollo del sarcoma de Ewing (Tanaka, K., Iwakuma, T., Harimaya, K., Sato, H., Iwamoto, Y.-J. Clin. Invest. 1997, 239-247; Toretsky, J.A., Connell, Y., Neckers, L., Bhat, K. J. Neuro-Oncology. 1997, 31, 9-16). El ARN está constituido en una mitad por la recombinación 5' *EWS*

(gen del cromosoma 22) y la otra mitad por la recombinación 3' (*Fli1* gen del cromosoma 11), que es una translocación de los cromosomas 22 y 11 para realizar una quimera 22/11.

El oncogén proteico contiene 1500 bases. Para inhibir el oncogén es necesario utilizar oligonucleótidos antisentido centrados en el "break point" (punto de rotura) del oncogén de fusión. En los artículos de la técnica anterior (Tanaka, K., Iwakuma, T., Harimaya, K., Sato, H., Iwamoto, Y. J. Clin. Invest. 1997, 239-247; Toretsky, J.A., Connell, Y., Neckers, L., Bhat, K. J. Neuro-Oncology. 1997, 31, 9-16), los autores identifican oligonucleótidos fosforotioatos capaces de inhibir al oncogén quimérico *in vitro* e *in vivo*: Estos oligonucleótidos son lineales.

En el marco de la presente invención, se prepararon oligonucleótidos fosforotioatos antisentido pero estructurados aquí por una estructura secundaria, con el fin por una parte de proteger al antisentido de la degradación y por otra parte facilitar su interacción con la diana y su eficacia *in vitro* e *in vivo*.

Para seleccionar la estructura secundaria mejor adaptada a la diana, la estructura secundaria de la diana se ha calculado con ayuda del programa "RNA Structure 3.21". La figura 14 en el anexo representa la estructura de esta diana. Se han analizado todas las secuencias de ARN EWS-Fli1 y 6 estructuras secundarias han conservado las estructuras de la diana. Los oligonucleótidos antisentido estructurados según la invención seleccionados contra esta diana son de dos tipos.

Se preparó un primer tipo denominado EF 2929AS cuya estructura está representada en la figura 15 A en el anexo. Éste no utiliza ningún elemento añadido con respecto a la diana para realizar la estructura secundaria.

La figura 15 B muestra las interacciones con la diana. Se forma en 3' una estructura con un bucle que interactúa con la diana e igualmente en 5' otra interacción con un bucle de la diana. El oligonucleótido estructurado EF 2929AS se presenta así pues como una sucesión complementaria de la diana. Con esta nueva concepción, las interacciones con la diana son múltiples, por una parte en 3' con un bucle y por otra parte en 5' "cadena sencilla" sobre un bucle de la propia diana.

Se preparó un segundo tipo de oligonucleótidos antisentido según la invención cuya estructura está representada en la figura 16 A en el anexo, junto a una estructura secundaria suplementaria en cada extremo 3' y 5'. La interacción se hace a la vez con la estructura secundaria al interior y con la diana al exterior a varios niveles. La figura 16 B muestra las interacciones con la diana.

De este modo, se preparó un oligonucleótido antisentido estructurado con un solo elemento de estructura secundaria junto al 5' denominado EF 3008AS. Como el oligonucleótido EF 2929AS, el oligonucleótido EF 3008AS fue concebido para, gracias a su estructura secundaria, interactuar no solamente en el seno del oligonucleótido estructurado sino también para tener interacciones múltiples a varios niveles en el interior de la diana.

Los diferentes oligonucleótidos estructurados realizados han sido ensayados en el plano de la protección de la actividad *in vivo* han sido estudiados igualmente una administración con nanopartículas (Transdrug®) un vector llamado Superfect® en el plano de la protección y de la eficacia.

La secuencia de los oligonucleótidos denominados EF 2929AS y 3008AS y de los controles correspondientes se representan en la figura 17 donde * representa los grupos fosforotioatos.

La secuencia del oligonucleótido EF 2929AS está representada en la lista de secuencia en el anexo bajo el número SEQ ID NO.1 y la secuencia del oligonucleótido 3008AS está representada en la lista de secuencia en el anexo bajo el número SEQ ID NO.2.

2) Resultados

a) Resistencia a la degradación

La capacidad de los oligonucleótidos EF 2929AS y EF 3008AS, realizados con una estructura secundaria según la invención para resistir una hidrólisis enzimática, se ha estudiado en DMEM suplementado con 10% de suero de ternero recién nacido (llamado NCS: *newborn calf serum heat inactivated*) y de suero humano (MH). Con el fin de evitar la escisión del fosfato marcado con (³²P), se han utilizado para este estudio oligonucleótidos con un fosfato protegido en 5' por un residuo etilo.

La figura 18 (en A: 3008AS) y (en B: 2929AS) se refiere al análisis de la degradación del oligonucleótido en el medio de cultivo que contiene suero de ternero recién nacido (NCS) o suero humano (MH), muestra que la estructura secundaria aumenta significativamente la resistencia de los oligonucleótidos a las nucleasas.

Se prepararon dos nanopartículas PIHCA (Transdrug®) de un tamaño de 65 nm (CD2) y 100 nm (CD3) según la patente Monza (BioAlliance), se obtuvo una preparación de oligonucleótidos adsorbidos sobre las nanopartículas. Se estudió la influencia de esta preparación con nanopartículas sobre la estabilidad del oligonucleótido en el DMEM suplementado al 10% con suero de ternero recién nacido, NCS, y de suero humano, MH. Como se puede observar en la

figura 18, los complejos formados por los oligonucleótidos adsorbidos con las nanopartículas presentan una resistencia más fuerte a la degradación nucleotídica que los oligonucleótidos solos.

b) Eficacia biológica

El método de medición de la inhibición de la proliferación celular es el siguiente:

- D1: se reparten 100.000 células EWS/Fli1 y 3T3 por pocillo en placas de seis pocillos (2 pocillos por punto).
- D2: Se lavaron las células en PBS y se añadieron 600 μ l de una solución al 10% de suero de ternero recién nacido (NCS).
- Los complejos de ODN se realizaron con SuperFect™ o Transdrug® (BioAlliance Pharma) diluidos en 200 μ l de medio sin NCS ni antibióticos y fueron añadidos a las células. Se añadió medio completo en cada pocillo para disponer de un volumen final de 800 μ l.
- D3: Después de la incubación con los ODN (16 horas después de la transfección), se lavaron las células con PBS y se añadió 1 ml de una solución NCS al 10%. Por la tarde se lavaron las células con PBS y se añadieron 600 μ l de una solución NCS al 10%.
- Se añadieron a las células los ODN con SuperFect™ diluidos en 200 μ l de medio sin NCS ni antibióticos. Se añadió medio completo en cada pocillo para disponer de un volumen final de 800 μ l.
- D4: Después de la incubación con los ODN (16 horas después de la transfección), se lavaron las células con PBS y se añadieron 400 μ l de tripsina. El crecimiento de las células se calculó inmediatamente.
- Un efecto de inhibición de los oligonucleótidos se ha calculado como

$$I(AO) = [N_1(AO) - N_0(AO)]/N,$$

donde

N = número de células sin oligonucleótidos

$N_0(AO)$ = número de células antes del transfección

$N_1(AO)$ = número de células dos días después de la primera transfección.

La inhibición de la proliferación celular se realizó en células 3T3 que expresaban EWS/Fli1, un control con las células 3T3 normales ha permitido medir el impacto de la inhibición del crecimiento celular. Los resultados se muestran en la figura 19 en anexo. Se reveló claramente que el oligonucleótido estructurado antisentido EF3008AS está activo bajo este criterio, comparado con el control negativo del oligonucleótido estructurado que tiene una secuencia invertida EF3008RLS. Se constata que EF3008AS indujo el 50% de la inhibición del crecimiento celular.

c) Modelo *in vivo* del sarcoma de EWING

El estudio ha sido realizado con ratones transgénicos (ratón atímico, modelo desarrollado en el seno del equipo de C. Auclair F. Subra) que expresan EWS/Fli1 y que presentan la enfermedad bajo forma de tumor (sarcoma de Ewing), este tumor palpable aparece entre 14 a 28 días después de la inyección de células tumorales.

Se puso en práctica el protocolo descrito más abajo.

Se prepararon ratones atímicos machos de 6 semanas de edad, que recibieron las células EWS/Fli1 a partir de cultivos celulares que fueron re-suspendidos a razón de 5 por 10⁶ células por mililitro en PBS, 200 microlitros de esta solución se inyectaron en cada ratón (grupo de 3 ratones por tipo de tratamiento ensayado). 14 a 28 días después de la inoculación, los tratamientos se inyectaron en vía intratumoral dentro de un tumor que tenía al menos un tamaño de 2 a 4 mm³, a continuación se realizaron otras 4 inyecciones en los días 5, 8, 12, 15 después de la primera inyección. Los animales se sacrificaron 21 días después de la última inyección.

El volumen tumoral se evaluó durante la experimentación mediante dos medidas perpendiculares (largo L y ancho W y el cálculo lleva a LW²/ 2).

Los grupos de tratamiento mostrados en las figuras 20 y 21 son los siguientes:

Grupo 1: Ratón control sin inyección de oligonucleótidos

ES 2 265 916 T3

Grupo 2: Ratón 1 2 3 oligonucleótidos antisentido estructurados 100 microlitros de PBS que contenía 20 microgramos de oligonucleótidos EF 3008 AS adsorbidos sobre nanopartículas (50 microgramos/ml) y 50 micromoles de CTAB. Tamaño de nanopartículas de 65 nanómetros.

Grupo 3: Ratón 1c,2c,3c oligonucleótidos control negativo EF 3008 RLS en las mismas condiciones que con las nanopartículas de 65 nanómetros.

Grupo 4: Ratón 1 2 3 oligonucleótidos antisentido estructurados 100 microlitros de PBS que contenía 20 microgramos de oligonucleótidos EF 3008 AS adsorbidos sobre nanopartículas (50 microgramos/ml) y 50 micromoles de CTAB. Tamaño de nanopartículas de 100 nanómetros.

Grupo 5: Ratón 1c, 2c, 3c oligonucleótidos control negativo EF 3008 RLS en las mismas condiciones que con las nanopartículas de 100 nanómetros.

Grupo 6: Ratón 1 2 3 oligonucleótidos antisentido estructurados 100 microlitros de PBS el contenía 20 microgramos de oligonucleótidos EF 3008 AS inyectados con Superfect™ 54 microgramos

Grupo 7: ratón 1AS, 2AS, 3AS oligonucleótidos control negativo EF 3008 RLS en las mismas condiciones sin Superfect™.

Se observa una eficacia *in vivo* con una estabilización del crecimiento tumoral por la inyección intratumoral de oligonucleótidos estructurados según la invención en comparación con los controles negativos, este efecto se observa igualmente en aquellos que son administrados con un vector utilizado clásicamente o al utilizar nanopartículas de tamaño diferente para facilitar la entrada intracelular de los oligonucleótidos.

Referencias bibliográficas

1. Curcio L. D.; Bouffard D. Y.; Scanlon K. J. *Pharmacol. Ther.*, 1997, 74, 317-332.
2. Wyngaarden J.; Potts J.; Cotter F.; Martin R. R.; Mehta V.; Agrawal S.; Eckstein F.; Levin A.; Black L.; Cole R.; Crooke S.; Kreig A.; Diasio R.; Gait M. J.; *Nature Biotech.*, 1997, 15, 519-524.
3. Agrawal S; *Trends Biotech.*, 1996, 14, 376-387.
4. Agrawal S.; *Prospect for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS*, 1991, 143-158.
5. Leiter J. M. E.; Agrawal S.; Palese P.; Zamecnik P. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, 87, 3430-3434.
6. Pagano J. S.; Jiménez G.; Sung N. S.; Raab-Traub N.; Lin J.-C.; *Antisense Strategies*. R., 1992, 107-116.
7. Steele C.; Cowser L. M.; Shillitoe E. J.; *Cancer Res.*, 1993, 53, 2330-2337.
8. Storey A.; Oates D.; Banks L.; Crawford L.; Crook T.; *Nucl. Acids. Res.*, 1991, 19(15), 4109-4114.
9. Kulka N.; Smith C. C.; Aurelian L.; Fischelevich R.; Meade K.; Mille P.; TS'O P. O. P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, 86, 6868-6872.
10. Hoke, G. D.; Drapear, K.; Viereis, S. M.; Desgonzáis. C.; Driver, V. B.; Funestos, M. C.; Búnker, D. J. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 5743-5748.
11. Estromas E.; *J. Trochemoche. Biophys. Methods*, 1986, 13, 97-102.
12. Ceder P. S.; Devine R. J.; Dagle J. M.; Walder J. A.; *Antisense Res. Dev.*, 1991, 1, 141-151.
13. Stephenson M. L.; Zamecnik P. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1978, 75, 285-288.
14. Bonfils E.; Depierreux C.; Midoux P.; Thoung N. T.; Monsigny M.; Roche A. C.; *Nucl. Acids. Res.*, 1992, 20(17), 4621-4629.
15. Wagner E.; Cotten M.; Mechtler K.; Kirlappos H.; Birnstiel M. L.; *Bioconjugate Chem.*, 1991, 2, 226-231
16. Leonetti J. P.; Degols G.; Lebleu B.; *Bioconjugate Chem.*, 1993, 1, 149-153.
17. Perrouault L.; Asseline U.; Rivalle C.; Thoung N. T.; Bisagni E.; Giovannangeli C.; Le Doan T.; Héline C.; *Nature*, 1990, 344, 358-360.
18. Camper H. B.; Reed M. W.; Cox T.; Virosco J. S.; Adams A. D.; Gall A. A.; Scholer J. K.; Meyer R. B. J.; *Nucl. Acids. Res.*, 1993 21(1), 145-150.

19. **Ortigao J. F. R.; Rösch H.; Selter H.; Fröhlich A.; Lorenz A.; Montenarh M.; Seliger H.**; *Antisense Res. Dev.*, 1992, 2, 129-146.
20. **Schaw, J. P.; Kent K.; Bird J.; Pishback J.; Froechler B.**; *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 747-750.
21. **Uhmalm E.; Peyman A.**; *Chem. Reviews*, 1990, 90, 544-584.
22. **Stein C. A.; Cohen J. S.**; *Cancer Res.*, 1998, 48, 2659-2668.
23. **Nielsen P. E.**; *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1995, 24, 167-183.
24. **Morvan F.; Porumb M.; Degols G.; Lefebvre I.; Pompon A.; Sproat B.S.; Rayner B.; Malvy C.; Lebleu B.; Imbach J.-L.**; *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 280-283.
25. **Stein C. A.**; *Chemistry & Biology*, 1996, 3, 319-323.
26. **Agrawal S.; Zhao Q.; Jiang Z.; Oliver C.; Giles H.; Heath J.; Serota D.**; *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1997, 7, 575-584.
27. **Branch A. D.** *TiBS*, 1998, 23, 45-50.
28. **Jansen B.; Wadl H.; Inoue S. A.; Trulzsch B.; Selzer E.; Duchene M.; Fichler H.; Wolf K.; Pehamberger H.**; *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 271-277.
29. **Henry S. P.; Zuckerman J. E.; Rojko J.; Hall W. S.; Harman R.J.; Kitchen D.; Crooke S. T.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1997, 12, 1-4.
30. **Khan I. M.; Coulson M.**; *Nucl. Acids Res.*, 1993, 21, 2957-2958.
31. **Poddevin B.; Meguenni S.; Elias I.; Vasseur M.; Blumenfeld M.**; *Antisense Res. Dev.*, 1994, 4, 147-154.
32. **Yoshizawa S.; Ueda T.; Ishido Y.; Miura K-i.; Watanabe F.; Hirao I.**; *Nucl. Acids Res.*, 1994, 22, 2217-2221.
33. **Tang J. Y.; Teinsamani J.; Agrawal S.**; *Nucl. Acids Res.*, 1993, 21, 2739-2735.
34. **Kuwasaki T.; Hosono K.; Takai K.; Ushijima K.; Nakashima H.; Saito T.; Yamamoto N.; Takaku H.**; *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1996, 228, 623-631.
35. **Barker R. H.; Metelev V.; Coakley A.; Zanecek P.**; *Exp. Parasitology*, 1998, 88, 51-59.
36. **Xodo L. E.; Manzini G.; Quadrifoglio P.; van der Marel G. A.; van Boom J.H.**; *Biochimie*, 1989, 71, 793-803.
37. **Petersheim M.; Turner D. H.**; *Biochem.*, 1982, 22, 256-263.
38. **Capaccioli S.; Di Pasquale G.; Mini E.; Mazzei T.; Quattrone A.**; *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, 1993, 197, 818-825.
39. **Chavany C.; Saison-Behmoaras T.; Le Doan T.; Puiseux F.; Couvreur P.; Helene C.**; *Pharm. Res.*, 1994, 11, 1370-1378.
40. **Delong R.; Stephenson K.; Loftus T.; Fisher M.; Alahari S.; Nolting A.; Juliano R. L.**; *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86, 762-764.
41. **Morris M. C.; Vidal P.; Chaloin L.; Heitz F.; Divita G.**; *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25, 2730-2736.
42. **Poxon S. W.; Mitchell P. M.; Liang E.; Hughes J. A.**; *Drug Delivery*, 1996, 3, 255-261.
43. **Couch R. J.**; *New Biologist*, 1990, 2, 771-777.
44. **Kukowska-Latallo J. F.; Bielinska A. U.; Jonson J.; Spindler R.; Tomalia D. A.; Baker J. R.**; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 4897-4902.
45. **Bielinska A.; Kukowska-Latallo J. F.; Jonson J.; Tomalia D. A.; Baker J. R.**; *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24, 2176-2182.
46. **Tang M. X.; Redemann C. T.; Szoka F. C.**; *Bioconjugate Chem.*, 1996, 7, 703-714.

REIVINDICACIONES

1. Utilización como principio activo de al menos uno de los oligonucleótidos representados en la lista de secuencia
bajo los números SEQ ID NO.1 o SEQ ID NO.2 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento
del sarcoma de EWING.

2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque los oligonucleótidos son idénticos o diferentes,
libres, encapsulados, acoplados, conjugados con sustancias diversas, asociados en dicha composición a un vehículo
farmacéuticamente aceptable.

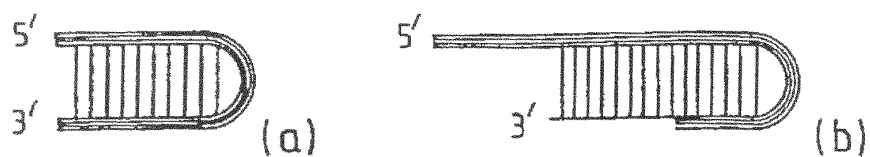


FIG. 1

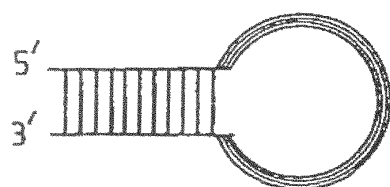


FIG. 2

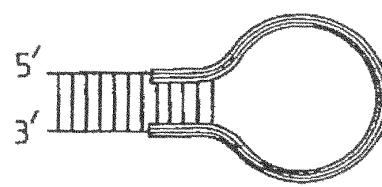


FIG. 3



FIG. 4

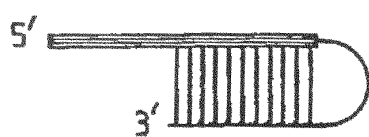


FIG. 5



FIG. 6

Fig. 7

SECUENCIAS DIANA

D 5'-d (CCAGCAGAATCGACACATGGCGTGTTC AACGCT)-3'
R 5'-r (CCAGCAGAAUCGACACAUGGCGUGUUCAACGCU)-3'

OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

21L 5'-TGAACACGCCATGTCGATTCT-3'

55L 5'-T₂ACT₃CT₅GCGTTGAACACGCCATGTCGATTCTT₅CT₅C₆-3'

21PS 5'-T*G* AACACGCCATGTCGATTCT* T-3'

H6 5'-TGAACACGCCATGTCGATTCT_T
3'-CTAAGA_T

H8 5'-TGAACACGCCATGTCGATTCT_T
3'-AGCTAAGA_T

H10 5'-TGAACACGCCATGTCGATTCT_T
3'-ACAGCTAAGA_T

Dh6 5'-TGAACACGCCATGTCGATTCT_T
3'-CTAAGA_T
TACTTGT-5'

L8 5'-GCGTA_TGAA_CACGC_C
3'-CGCAT_TCTT_AGCTG_T

L10 5'-GCGCTTA_TGAA_CACGC_C
3'-CGCGAAT_TCTT_AGCTG_T

fig.8a



fig.8b

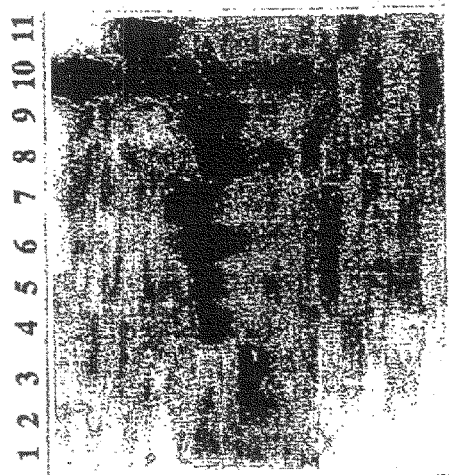
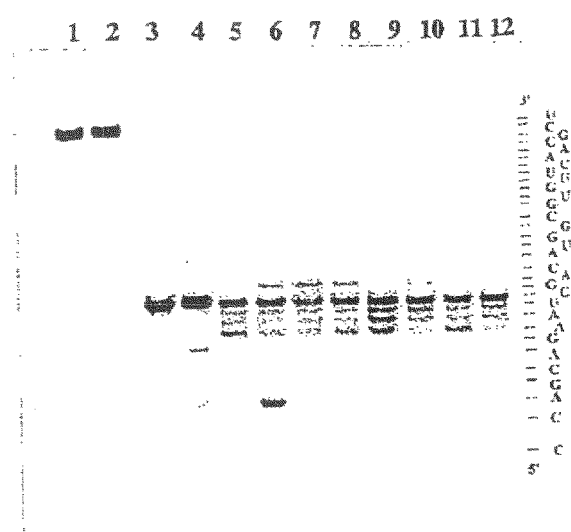


Fig.9



H10

Fig.10

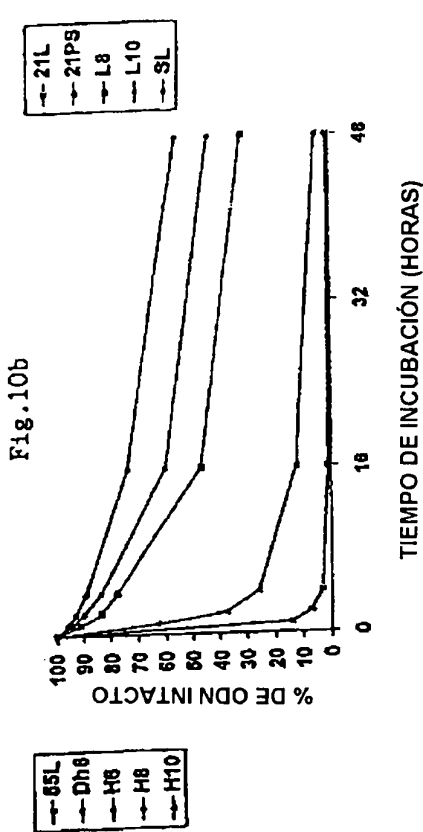


Fig.10b

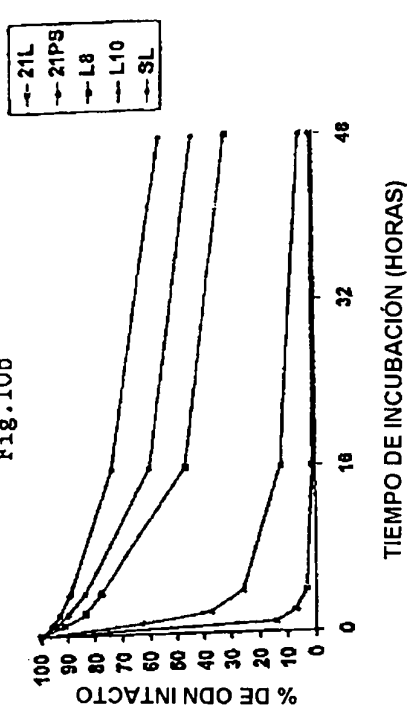


fig.10d

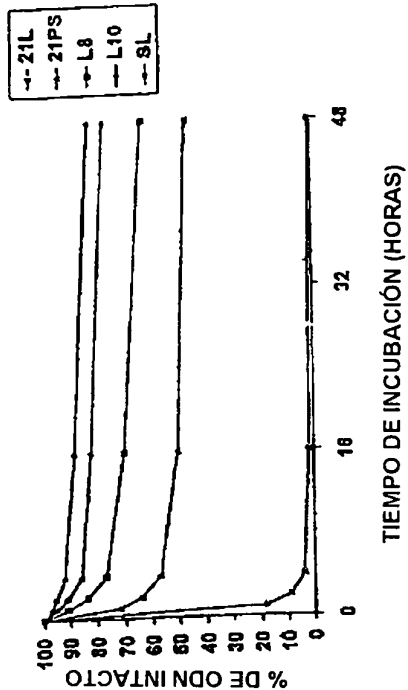
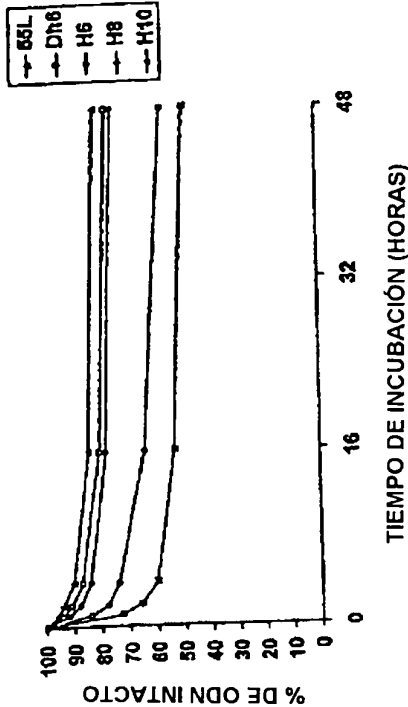


Fig.10c



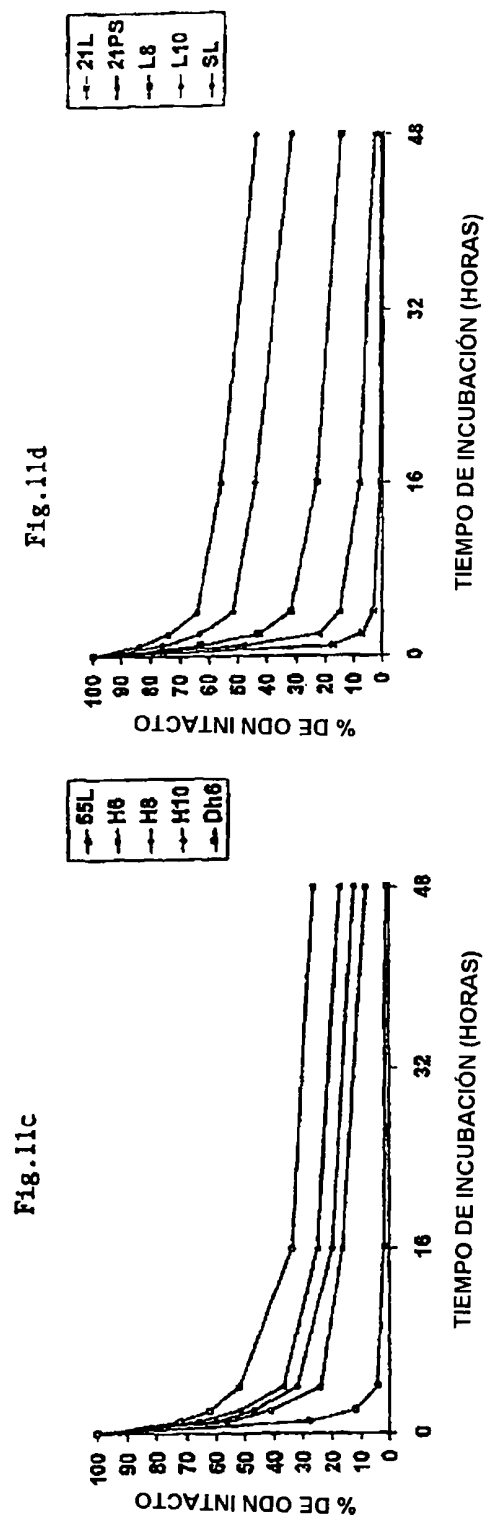
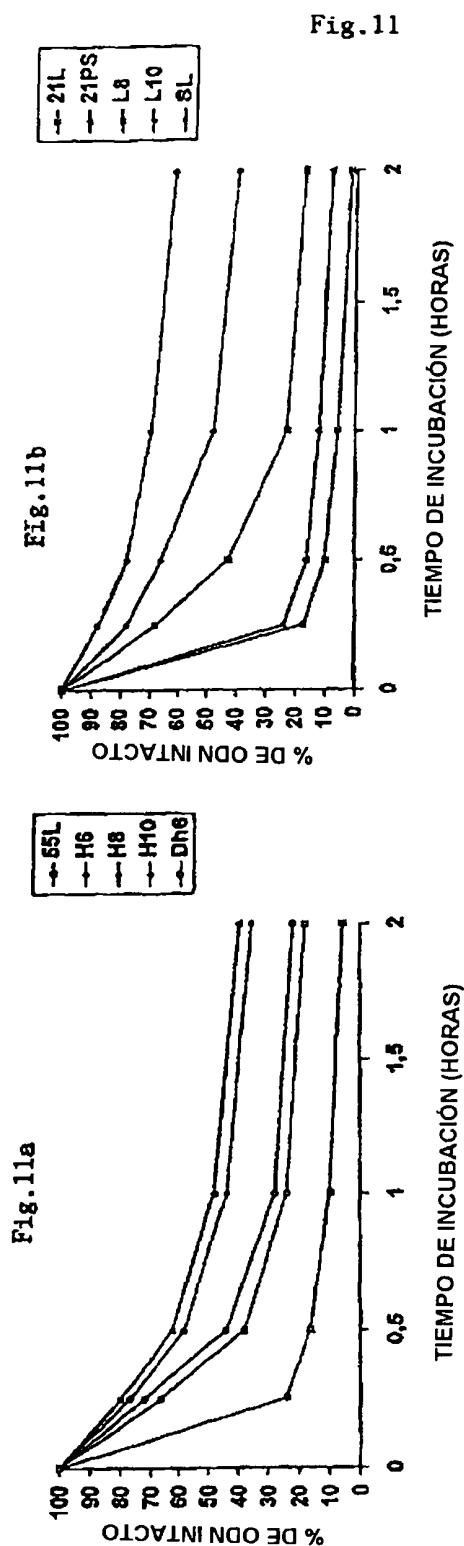


Fig.12

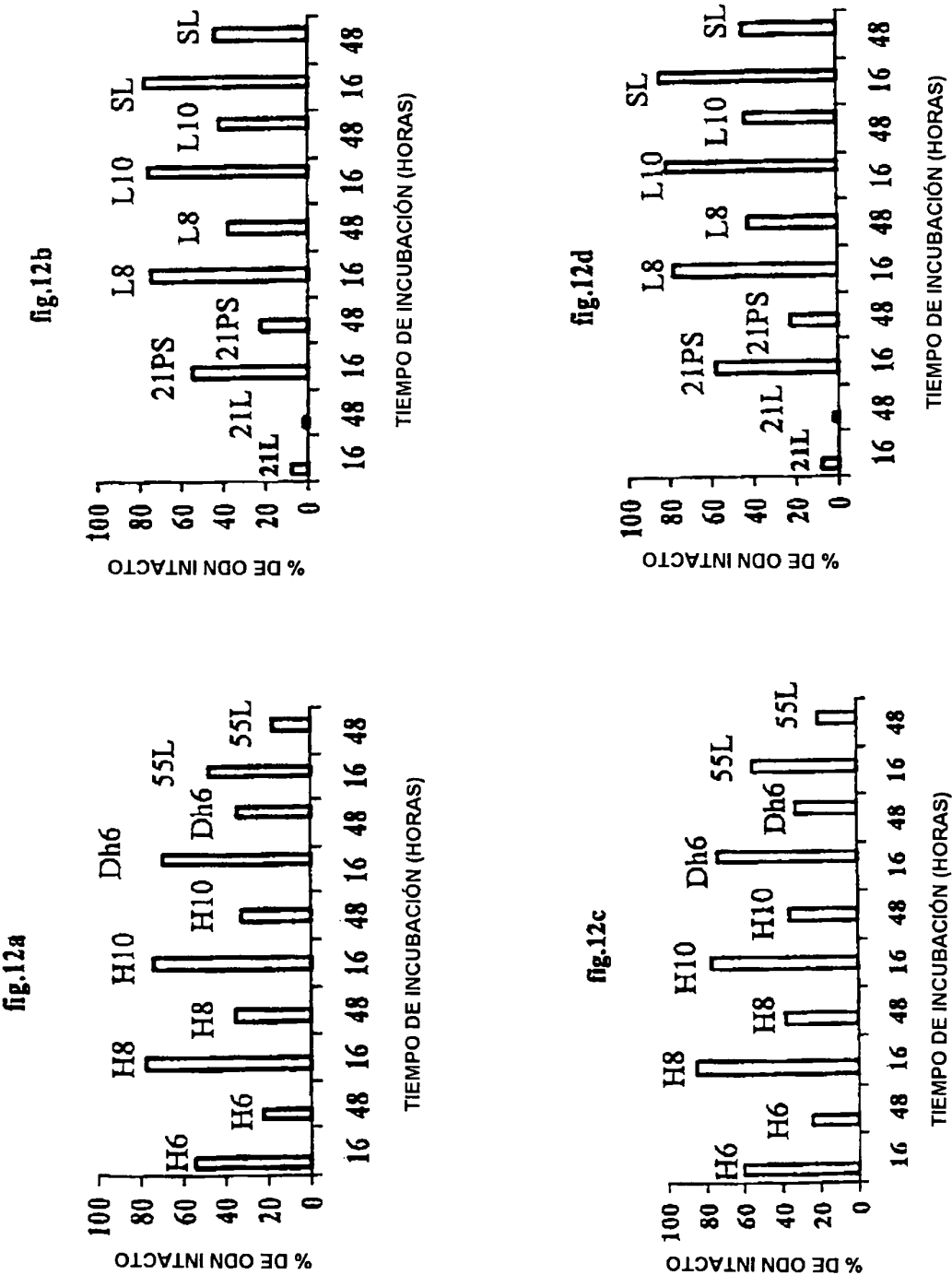


Fig.13

Oligonucleótidos fosfodiésteres

<u>Dh INGFP</u>		
12	$\begin{array}{c} \text{T} \text{ CTCGAC-5' } \quad 3' \text{-CGGCAG T} \\ \text{T} \text{ GAGCTGCACGCTGCCGTC T} \end{array}$	15-25
<u>Sh-6 INGFP</u>		
13	$\begin{array}{c} \quad \quad \quad 3' \text{-CGGCAG T} \\ 5' \text{-GAGCTGCACGCTGCCGTC T} \end{array}$	15-25
<u>L4 INGFP</u>		
14	$\begin{array}{c} 5' \text{-GCGA GCT GCA C} \\ 3' \text{-CGCT GC CGT C} \end{array}$	15-25
<u>L2 INGFP</u>		
15	$\begin{array}{c} 5' \text{-GA GCT GCA C} \\ 3' \text{-CT GC CGT C} \end{array}$	5-10
<u>L7 INGFP</u>		
16	$\begin{array}{c} 5' \text{-GCGTAGA GCT GCA C} \\ 3' \text{-CGCATCT GC CGT C} \end{array}$	10-15
<u>C7 INGFP (control negativo)</u>		
17	$\begin{array}{c} \quad \quad \quad \text{GCC GTC} \\ 5' \text{-GCGTAGA} \quad \quad \quad \text{A} \\ 3' \text{-CGCATCT} \quad \quad \quad \text{C} \\ \quad \quad \quad \text{GC TGC G} \end{array}$	0

<u>L2 INGFP 2S</u>		
18	$\begin{array}{c} \text{GCT} \\ 5' \text{-G*A*} \quad \text{GCA C} \\ 3' \text{-C*T*} \quad \text{GC CGT C} \end{array}$	65-80
<u>L4 INGFP 2S</u>		
19	$\begin{array}{c} \text{GCT GCA C} \\ 5' \text{-G*C*GA} \quad \text{G} \\ 3' \text{-C*G*CT} \quad \text{GCG CGT C} \end{array}$	30-40
<u>SDh INGFP</u>		
20	$\begin{array}{c} \quad \quad \quad 3' \text{-G*G*CAG C} \\ \text{C} \quad \text{A} \quad \text{CGCTG C C GTC C} \\ \quad \quad \quad \text{G T CGA* G*-5'} \end{array}$	15-30
<u>21 PS (control negativo)</u>		
5'-T*G*AACACGCCCATGTCGATTC*T*-3'		0

*: agrupamiento fosforotioato

Fig.14

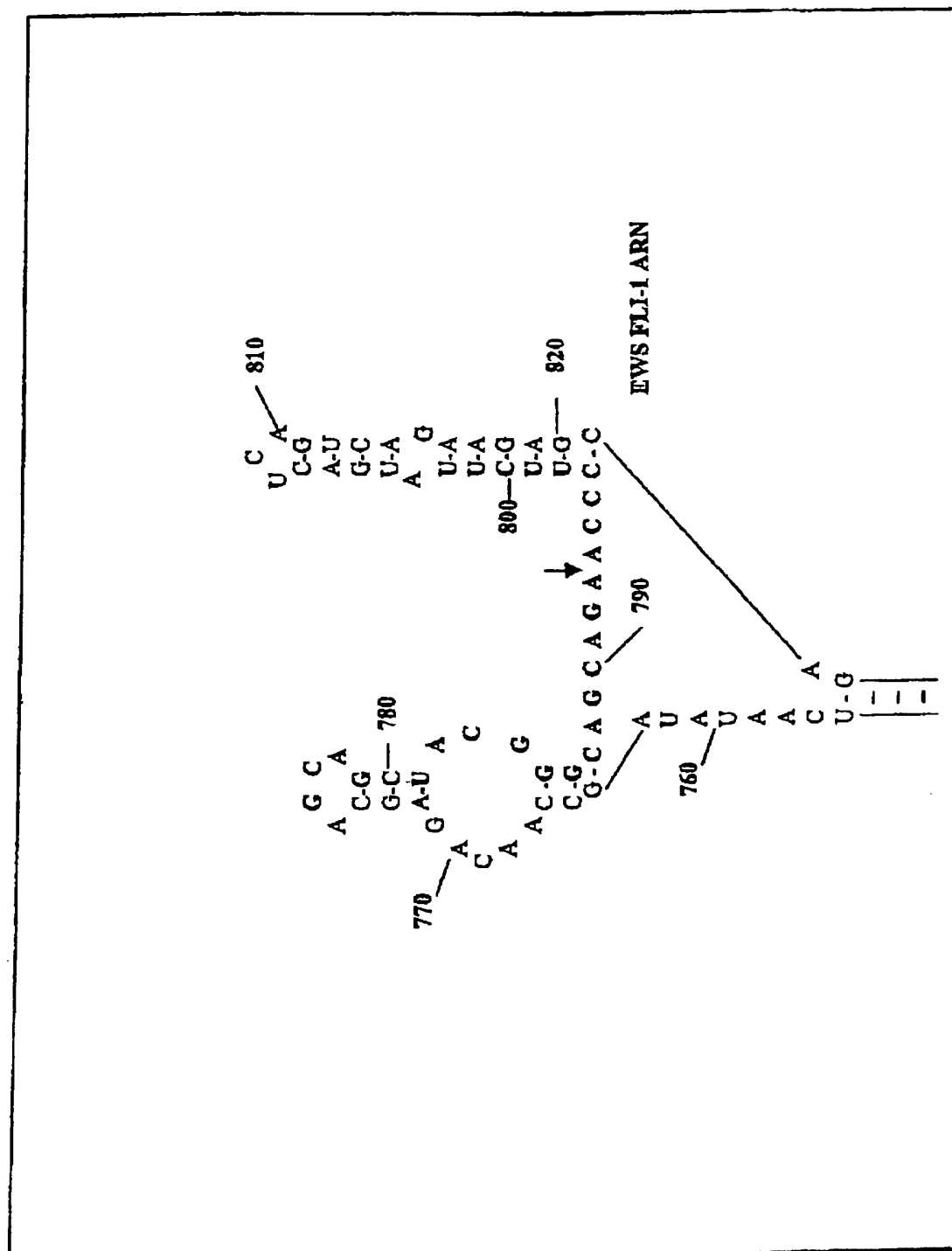


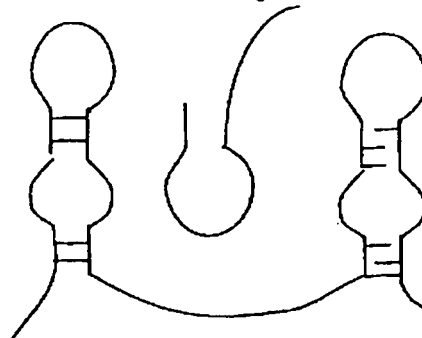
Fig.15

Fig.15A



A

Fig.15B



B

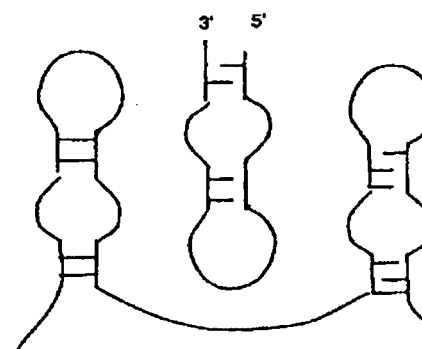
Fig.16

Fig.16A



A

Fig.16B



B

Fig.17

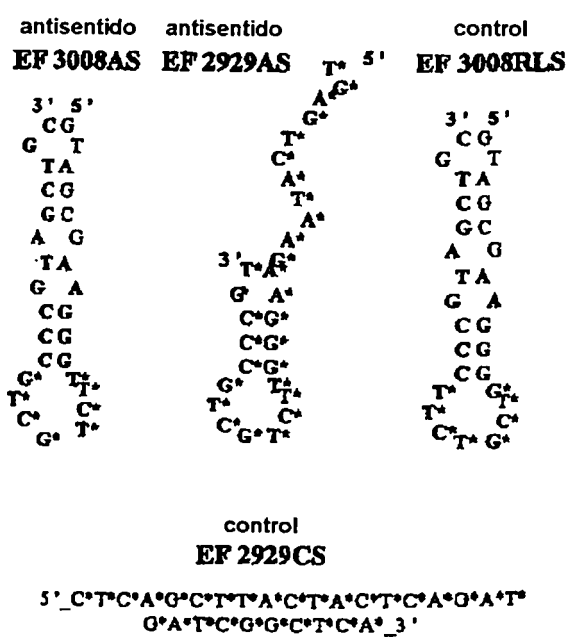


Fig.18

fig.18a

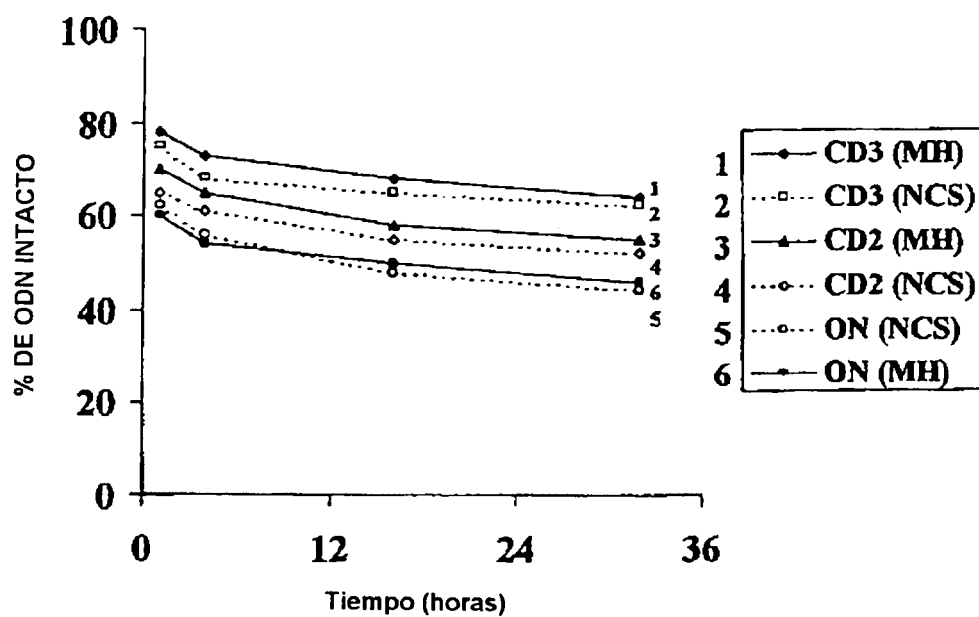


fig.18b

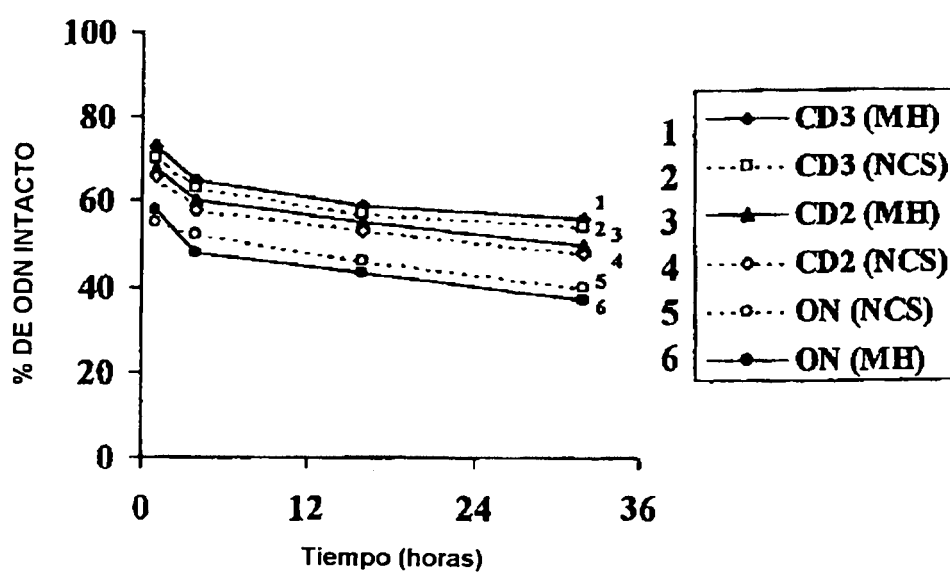


Fig. 19

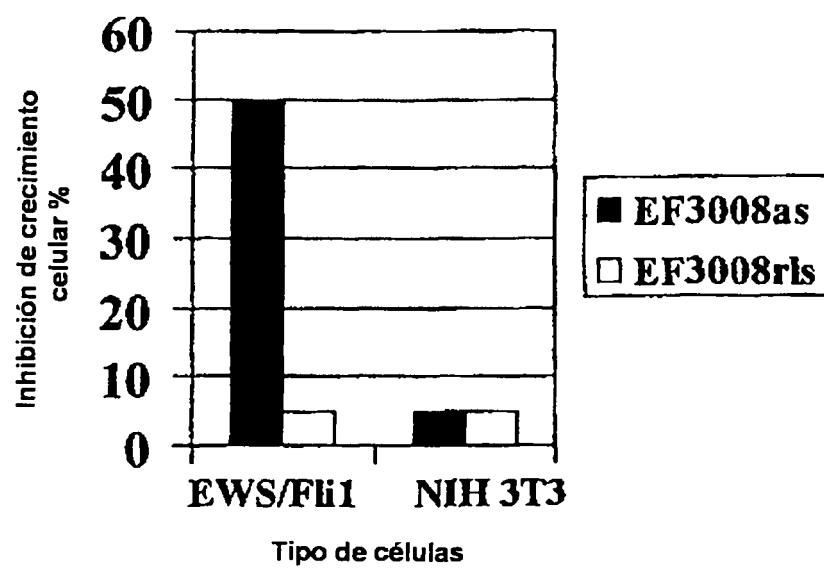


Fig.20

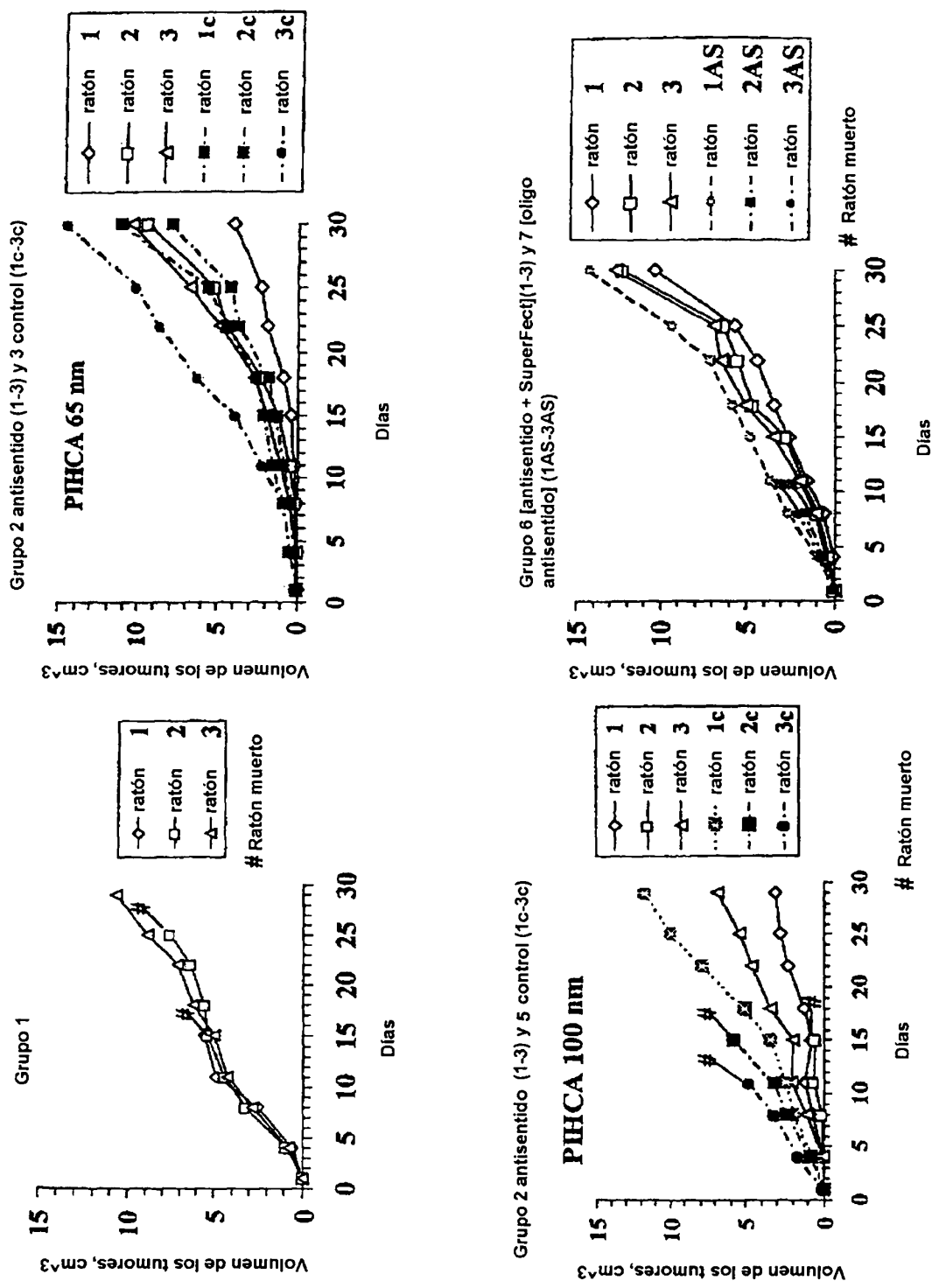
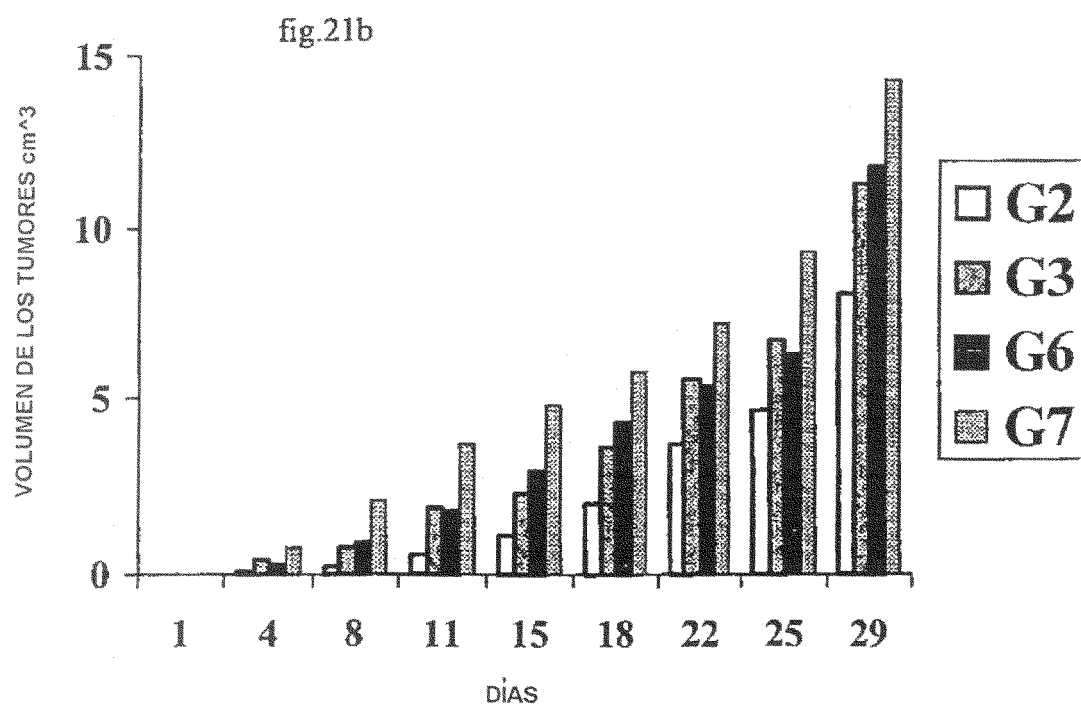
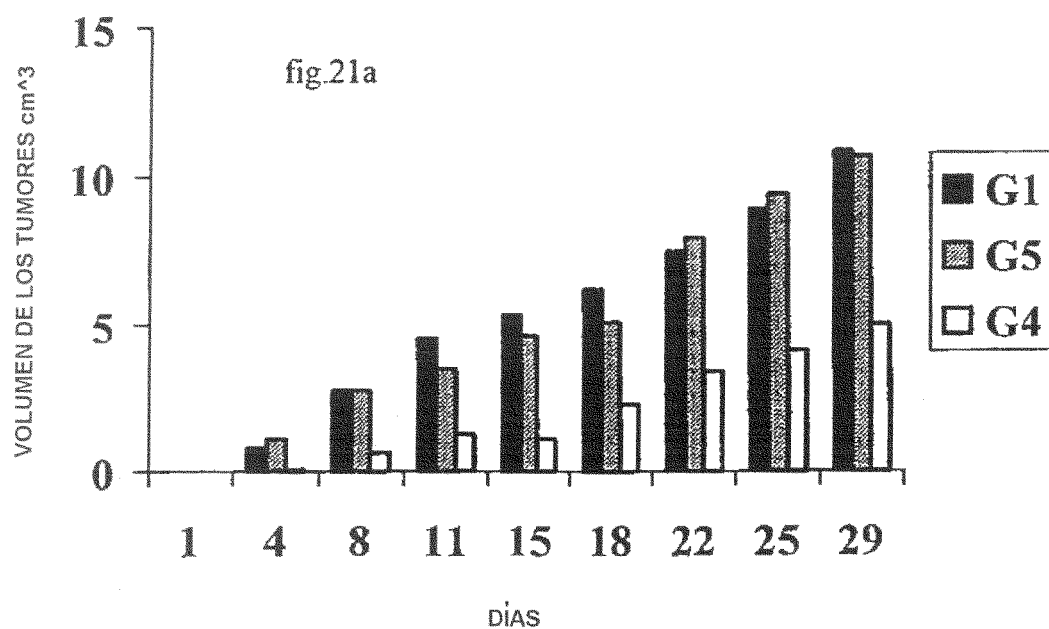


Fig.21



ES 2 265 916 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Bioalliance Pharma S.A.	
5	<120> Oligonucleótidos que contienen una secuencia antisentido estabilizados por una estructura secundaria y composiciones farmacéuticas que los contienen	
	<130> 2890PCT1	
10	<140> FR99/02921	
	<141> 1999-03-09	
15	<160> 2	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
20	<210> 1	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
30	<220>	
	<221> aspectos misceláneos	
	<222> (1)..(29)	
	<223> Cada nucleótido de la secuencia es un fosforotioato	
35	<400> 1	
	tgagtcataa gaagggttct gctgcccg	29
40	<210> 2	
	<211> 30	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_feature	
55	<222> ()..(19)	
	<223> Los nucleótidos que ocupan una posición de 12 a 19 son fosforotioatos	
60	<400> 2	
	gtagcgaagg gttctgctgc ccgtagctgc	30

65