



(11) *Número de Publicação*: PT 888372 E

(51) *Classificação Internacional*: (Ed. 6)
C07H021/00 A C07H017/04 B
A61K031/70 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito*: 1997.03.12

(30) *Prioridade*: 1996.03.13 IT FI960044

(43) *Data de publicação do pedido*:
1999.01.07

(45) *Data e BPI da concessão*:
2001.08.16

(73) *Titular(es)*:

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
PIAZZALE ALDO MORO, 7 00185 ROMA

IT

(72) *Inventor(es)*:

FEDERICO ARCAMONE
GIUSEPPE GIANNINI
ANNA MARIA GARBESI
STEFANIA BONAZZI
STEFANIA ZANELLA

IT
IT
IT
IT
IT

(74) *Mandatário(s)*:

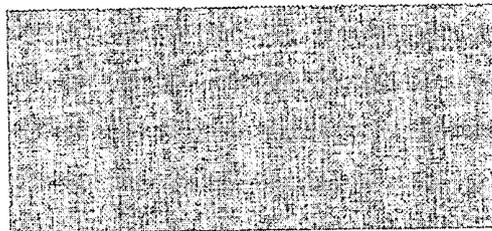
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA

PT

(54) *Epígrafe*: CONJUGADOS OLIGONUCLEÓTIDO-ANTRACICLINA E OLIGONUCLEÓTIDO-ANTRACICLINONA

(57) *Resumo*:

CONJUGADOS OLIGONUCLEÓTIDO-ANTRACICLINA E OLIGONUCLEÓTIDO-ANTRACICLINONA





DESCRIÇÃO

"Conjugados oligonucleótido-antraciclina e oligonucleótido-antraciclina"

A presente invenção refere-se a conjugados em que um oligonucleótido natural ou modificado, capaz de formar uma hélice tripla específica com uma cadeia de ADN, é ligado, através de um ligante apropriado, à porção aglicona de uma antraciclina ou a uma antraciclina, e à sua utilização para o controlo específico de expressão génica.

Estado da arte

Sabe-se [Claude Hélène *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1049, 99-125 (1990); Uhlman E. *et al.*, *Chemical Reviews*, 90, 543-584 (1990)] que se podem utilizar oligonucleótidos sintéticos para inibir selectivamente a expressão de um gene por ligação ao ARNm (mecanismo anti-sentido) ou ao ADN (mecanismo antigénico). No primeiro caso, o oligonucleótido liga-se, através de ligações de hidrogénio, a uma sequência complementar de Watson-Crick, presente no ARNm alvo e interfere na síntese da proteína correspondente. No segundo caso, o oligonucleótido reconhece e liga-se apenas a uma região polipurina:polipirimidina de ADN em cadeia dupla.

O oligómero sintético, que se coloca no sulco principal do ADN alvo, conduz à formação de um segmento em hélice tripla através de ligações de hidrogénio de Hoogsteen ou de Hoogsteen inversas, com a cadeia de purinas. A presença da estrutura em hélice tripla pode interferir na replicação e na transcrição do gene através de vários mecanismos. De modo a ter um efeito permanente, é necessário que a estrutura da hélice tripla seja termodinamicamente estável. Esta estabilidade pode ser aumentada através de uma molécula apropriada (intercalante) adicionada a uma ou a ambas as extremidades do oligonucleótido [Nguyen T. Thuong *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 666-690 (1993)]. Entre as moléculas intercalantes, investigou-se já a daunorubicina [V.F. Zarytova *et al.*, *Nucleosides and Nucleotides*, 10, 575-577 (1991); U. Asseline *et al.*, *Tetrahedron*, 48, 1233-1254 (1992)] mas os resultados obtidos não são considerados satisfatórios, uma vez que o aumento na estabilidade do complexo em hélice tripla assim obtido é semelhante ao apresentado por outros conjugados já estudados [T. Montaney-Garestier *et al.*, *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interaction*, Kluwer Academic

Publishers, p.275-290, Holanda (1990)]. É portanto claro o interesse de novos conjugados com um resíduo molecular que infira uma maior estabilidade às estruturas em hélice tripla que formam.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção refere-se a novos conjugados em que um oligonucleótido natural ou modificado sinteticamente, capaz de formar uma hélice tripla estável com regiões de ADN específicas, é covalentemente ligado através de um ligante apropriado, à porção aglicona de uma antraciclina ou a uma antraciclina. Surpreendentemente, este modo particular de ligar o oligonucleótido ao intercalante é muito eficiente para obter os resultados desejados, *i.e.*, uma maior estabilidade em comparação com a de conjugados descritos na arte.

Os oligonucleótidos capazes de formar uma hélice tripla com uma cadeia de ADN são conhecidos e estão descritos, por exemplo, em: Nguyen T. Thuong *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 666-690 (1993).

Entre os oligonucleótidos, de acordo com a presente invenção, preferem-se os oligodesoxinucleótidos (ODN). Em particular, de acordo com a invenção, podem-se utilizar os seguintes ODN:

5'd(T₃CT₂CT₂CT₂); 5'd(T₂GTG₂TG₂T₂GTG₂); 5'd(GAGA₆(GA)₃);
5'd(T₃C^{5Me}T₂C^{5Me}T₂C^{5Me}T₂); 5'd(TC^{5Me}₃T₆C^{5Me}TC^{5Me}); 5'd(TGTGT₅GT₃GT₂T₄GT₃);
5'd(T₄C^{5Me}T₄G₆).

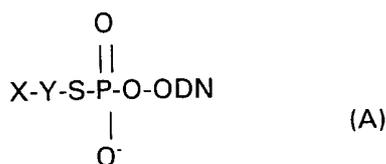
Também os ligantes utilizados de acordo com a presente invenção são os ligantes vulgarmente utilizados neste campo [veja-se, por exemplo: Nguyen T. Thuong *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 666-690 (1993)]; D.J. Kessler *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21, 4810-4815 (1993)].

Em particular, utilizam-se os seguintes ligantes:

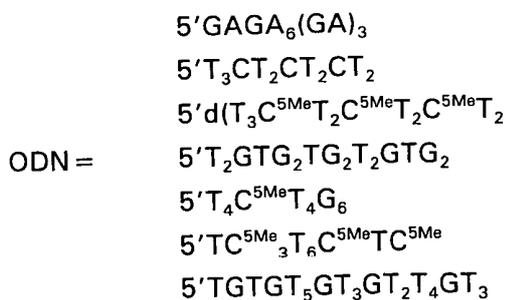
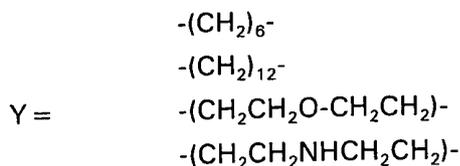
-(CH₂)_n-, -(CH₂-CH₂-O)_m-, -(CH₂-CH₂-CH₂-O)_p-, [(CH₂)_{2.5}-NH]_q-, [(CH₂)_{2.5}-S(O)₂]_q em que n é um número inteiro de 4 a 30, p é um número inteiro de 1 a 6, m e q, iguais ou diferentes, são números inteiros de 2 a 9. De entre as antraciclina úteis, de acordo com a invenção, encontram-se, por exemplo, as antraciclina naturais ou sintéticas possuindo um grupo OH livre na posição 4 e/ou 6. Em particular: daunorubicina, doxorubicina, carminomicina (ou as correspondentes

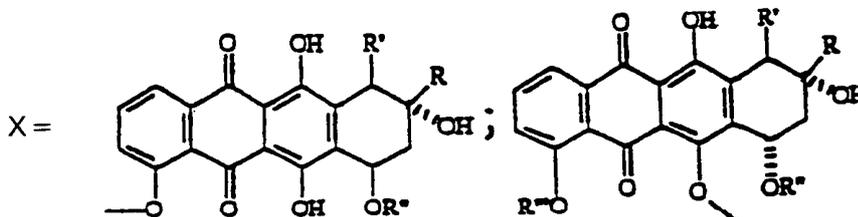
aglíconas), os correspondentes derivados 5-imino e os correspondentes derivados 3'-alfa-cianomorfolinilo.

De acordo com uma concretização particular da invenção, o oligonucleótido é ligado, através do ligante, ao anel D da antraciclina ou da aglícona, como, por exemplo, na posição 4. De acordo com outra concretização particular da invenção, o oligonucleótido é ligado ao anel B da aglícona, como por exemplo na posição 6. A invenção refere-se também a conjugados em que o oligonucleótido capaz de formar uma hélice tripla com a cadeia de ADN é ligado, através de dois ligantes colocados nas suas extremidades opostas, a duas moléculas de antraciclina (nas porções aglícona) ou a duas moléculas de antraciclina, sendo estas antraciclina ou antraciclina iguais ou diferentes. Os exemplos de conjugados de acordo com a invenção são esquematicamente representados pela Fórmula A:



em que:





em que:

R = COCH₃, COCH₂OH, COCH₂OAc, C₂H₅; R' = H, OH, COOCH₃; R'' = H, daunosamina; R''' = H, CH₃.

Os conjugados de acordo com a invenção são preparados, por exemplo, seguindo o processo aqui adiante descrito.

Primeiro que tudo, preparam-se os correspondentes derivados halogenados da antraciclina ou da antraciclina (veja-se também o Esquema 1).

A aglicona 1, obtida com elevados rendimentos por técnicas conhecidas, é tratada com um excesso de 1,6-di-iodo-hexano em clorofórmio em refluxo na presença de óxido de prata. A cromatografia em coluna do produto bruto obtido permite a separação dos correspondentes derivados omega-iodo-hexametileno, 2 e 3. O composto 3 é facilmente glicosilado com o açúcar protegido 4 na presença de trimetilsililtriflato, originando o composto 5. De acordo com a invenção, os oligonucleótidos são preparados por síntese em fase sólida num sintetizador automático (Pharmacia) utilizando fosforoamidetos, para obter os correspondentes derivados 5'-tiofosfato. São normalmente obtidos rendimentos de acoplamento de cerca de 96%. Após desproteção, os oligonucleótidos são purificados por cromatografia preparativa de permuta iónica. As fracções são analisadas por HPLC de permuta iónica. As fracções possuindo uma pureza superior a 90% são transformadas no sal de sódio correspondente e liofilizadas.

Os derivados halogenados acima referidos, 2, 3 e 5, deixam-se então reagir com o sal de sódio do 5'-tiofosfato-oligonucleótido na presença de 15-coroa-5 em DMF/H₂O originando os conjugados finais desejados que são purificados por HPLC (veja-se o Esquema 2).

Exemplo 1

O-alkilação de carminomicinona

A uma solução de carminomicinona [composto de fórmula (1) em que: R = CO-CH₃ e R' = H] (2,64 g; 6,9 mmol) em CHCl₃ anidro (400 ml), adicionam-se sob agitação, 1,6-di-iodo-hexano (16,88 g; 50 mmol) e Ag₂O (2,5 g; 11 mmol). Mantém-se a mistura em refluxo durante 4 dias, e a diminuição do produto de partida é verificada por TLC (CH₂Cl₂/acetona 98:2) e adiciona-se Ag₂O (7 mmol) no terceiro e no quarto dias. No final, a mistura é filtrada em papel de filtro, à temperatura ambiente, para remover os sais de prata e o solvente é eliminado sob pressão reduzida. O resíduo é tratado com pentano, para separar o derivado halogenado que não reagiu e o produto assim obtido é submetido a cromatografia em sílica gel (CH₂Cl₂/acetona 98:2). Obtêm-se dois produtos sólidos: um é vermelho (620 mg) e o outro é amarelo (579 mg); a sua estrutura foi determinada por espectrometria de massa e RMN de ¹H e de ¹³C. O produto vermelho é 4-dimetoxi-4-O-(6-iodo-hexil)carminomicinona, enquanto o produto amarelo é 4-dimetoxi-6-O-(6-iodo-hexil)carminomicinona.

Exemplo 2

Glicosidação

A uma mistura de 4-dimetoxi-4-O-(6-iodo-hexil)carminomicinona (obtida de acordo com o Exemplo 1) (270 mg; 0,454 mmol) e N-aliloxi-1,4-bis(4-nitrobenzoi)daunosamina (obtida de acordo com técnicas conhecidas) (541 mg; 1,01 mmol) adicionam-se peneiros moleculares de 4 A (2,8 g), tratados à chama, sob condições anidras; depois adicionam-se também à mistura CH₂Cl₂ (90 ml), Et₂O (23 ml) e trimetilsililtriflato (0,38 ml), a -5°C. Após 15' a reacção está completa. A 0°C adiciona-se uma solução a 1% de bicarbonato de sódio (25 ml) e diluiu-se a mistura com CH₂Cl₂ e depois extracta-se com o mesmo solvente. As fracções orgânicas são lavadas com bicarbonato a 1% e depois com água até à neutralidade. A partir da fase orgânica, após anidrificação e evaporação do solvente, obtém-se a 4-desmetoxi-4-O-(6-iodo-hexil)daunomicina protegida em bruto (330 mg).

Exemplo 3

Desproteção

Dissolve-se o produto de acordo com o Exemplo 2 (330 mg) em metanol (144 ml) e cloreto de metileno; arrefece-se a solução a -5°C e adiciona-se uma solução de K_2CO_3 0,5 M (1,8 ml). O decorrer da reacção é verificado por TLC ($\text{CHCl}_3/\text{iPrOH}$ 95:5) e esta está completa em 1 h. Adiciona-se à mistura reaccional HCl 0,05 N até à mudança de cor de violeta para laranja, concentra-se sob pressão reduzida a baixa temperatura e finalmente adiciona-se CH_2Cl_2 . Lava-se a solução orgânica com água e seca-se, remove-se o solvente sob pressão reduzida. Dissolve-se o resíduo em 50 ml de CH_2Cl_2 anidro e adicionam-se Ph_3P (8,25 mg; 0,0315 mmol), Pd(0) -tetraquis (11 mg, 0,0095 mmol) e ácido 2-metilbutírico (80 mg; 0,78 mmol). A reacção é realizada no escuro e o decorrer da reacção é verificado por TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:7,5:1,5:0,5). No final, dilui-se a mistura reaccional com CH_2Cl_2 , lava-se com NaHCO_3 e H_2O , seca-se e evapora-se. O produto em bruto, a 4-dimetoxi-4-O-(6-iodo-hexil)daunomicina, é purificado por HPLC preparativa. A identidade do produto purificado é confirmada por espectrometria de massa (FAB MS^+ 724).

Exemplo 4

Síntese do 5'-fosforotioato-oligodesoxinucleótido

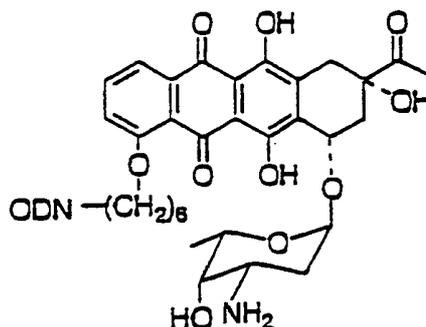
ps-5'-TTT CTT CTT CTT (ODN)

A síntese é realizada com um sintetizador automático utilizando o método do "fosforoamideto". No final da fase de crescimento do ODN, após destitilação, uma mistura de N,N-di-isopropil-(bis)cianoetilfosfito 0,1 M em CH_3CN (100 μl) e tetrazolo 0,5 M em CH_3CN (150 μl) é reciclada para a coluna reaccional durante 7 min., com um caudal de 1 ml/min (três vezes). Após lavagem com CH_3CN a reacção de tio-oxidação com enxofre é realizada utilizando uma solução 0,1 M em CH_3CN de reagente de Beaucage que é passado através da coluna reaccional durante 40 s, com um caudal de 1 ml/min. No final da síntese o ODN ligado ao substrato sólido é tratado com NH_3 a 28% a 50°C durante 24 h. Purifica-se o produto bruto por cromatografia de permuta iónica preparativa (coluna: h = 12 cm; diam. = 2 cm) e analisam-se as fracções que contêm o produto por HPLC de permuta iónica. Reúnem-se as fracções possuindo uma pureza superior a 90%, transformam-se no sal de sódio correspondente através de uma resina DOWEX 50 WX 8^R, tratam-se repetidamente com resina CHELEX^R para eliminar possíveis resíduos de metais

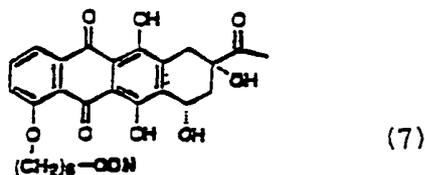
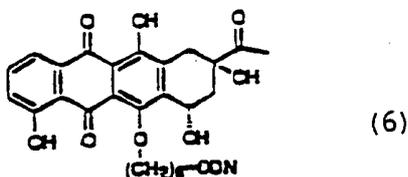
bivalentes e liofilizam-se. O 5'-tiofosfato-oligodesoxinucleótido assim obtido é caracterizado, em relação ao ODN que não reagiu, por TLC, RMN de ^{31}P , espectrometria de massa de vaporização electrónica.

Exemplo 5

Síntese de conjugado (8)



Ao sal de sódio do ODN obtido no Exemplo 4 anterior (0,1 μmol) dissolvido em DMF (125 μl) e H_2O (50 μl), na presença de 15-coroa-5 (13 μl), adiciona-se 1 mg de 4-desmetoxi-4-O-(6-iodo-hexil)daunomicina. Deixa-se a mistura reaccional a 50°C , verificando a formação do conjugado por HPLC de fase inversa. Quando o ODN de partida está completamente consumido, elimina-se o excesso de antraciclina por cromatografia em coluna utilizando sílica gel de fase inversa RP-18. Putrifica-se o conjugado bruto por HPLC de fase inversa e caracteriza-se por HPLC, UV e espectroscopia de fluorescência. Analogamente, obtêm-se os produtos seguintes:

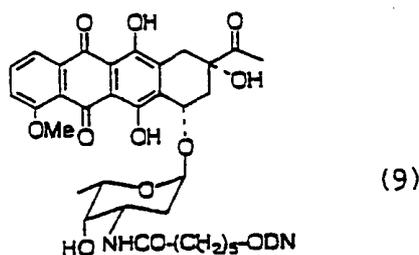


Testes de ligação

A afinidade dos conjugados de acordo com a invenção para a sequência alvo em cadeias duplas (B):

5' AGGACGAAAGAAGAAGAACTTT (B)
3' TCCTGCTTTCTTCTTCTTCTTGAAA

é determinada por espectroscopia de UV e de fluorescência. Uma vez no ODN que forma hélices triplas estão presentes citidinas não metiladas, a sua força de ligação é uma função do pH, portanto a estabilidade dos complexos em hélice tripla é medida a pH 5,5; 6,5; 6,8. Comparam-se os valores de estabilidade térmica dos complexos em hélice tripla formados pelo alvo (B) e os conjugados 6-8 (descritos atrás), o conjugado 9



(preparado como descrito por Asseline, U. *et al.*, *Tetrahedron*, 43, 1233-1254 (1992)), e o oligodesoxinucleótido não derivatizado (10).

OH-TTT CTT CTT CTT (10)

A dissociação é monitorizada medindo a variação da absorvância a 260 nm com o aumento da temperatura. A partir das curvas de fusão, obtidas representando os valores de absorvância às várias temperaturas, obtêm-se os valores de Tm (temperatura de 50% de dissociação da hélice tripla em hélice dupla alvo e cadeia simples) reportados na Tabela 1. A formação da hélice tripla entre os ligandos atrás referidos e o ADN alvo (B) é confirmada por electroforese em gel a 15°C, pH 5,5. Os dados recolhidos mostram que, para todos os valores de pH investigados, a presença de um derivado de

daunomicina ligado covalentemente, através do ligante hexametileno, na extremidade 5' do dodecâmero origina complexos que são muito mais estáveis (com excepção de 9) do que os formados pelo ODN não derivatizado (10). O aumento de estabilidade térmica da hélice tripla devido aos cromóforos de antraciclina é elevado e semelhante para todos os conjugados 6-8. Pelo contrário, o conjugado 9 forma um complexo menos estável. Esta diferença é particularmente evidente a pH 6,8, onde a contribuição do ODN para a estabilidade do complexo é muito pequena; a 20°C, enquanto as hélices triplas formadas pelos conjugados 6-8 estão grandemente dissociadas, a formada pelo conjugado 9 está quase completamente desnaturada. O facto de a maior estabilidade dos complexos formados pelos conjugados de acordo com a presente invenção ser devida à intercalação da porção aglicona no ADN alvo é confirmado por medições espectrofluorométricas. Sabe-se de facto que a fluorescência das antraciclinas é diminuída pela sua intercalação entre pares de bases de ADN. A intensidade de fluorescência a 590 nm do complexo em hélice tripla a pH 5,5 é medida a 25°C e comparada com a obtida à mesma temperatura após aumento do pH para 8,2, uma condição que não é compatível com a existência da hélice tripla que envolve citidinas na terceira cadeia. A fluorescência medida a pH 8,2 é consideravelmente superior (cerca de três vezes) do que a medida a pH ácidos e comparável com a obtida ao mesmo pH na ausência do alvo de ADN em hélice dupla. Estes resultados mostram que a forte afinidade para o ADN de cadeia dupla dos conjugados de acordo com a invenção é uma consequência da intercalação do cromóforo de antraciclina no complexo em hélice tripla. O comportamento dos conjugados de acordo com a invenção como ligandos bifuncionais de ADN é confirmado pelo facto de que a porção intercalante não permanece intercalada a valores de pH que não são compatíveis com as características de ligação da cadeia oligopirimidina. É portanto evidente que os conjugados obtidos de acordo com a invenção representam produtos capazes de formar complexos específicos de sequências mais estáveis, como requerido pela tecnologia de antigénios, com o ácido nucleico alvo. É também importante notar que a ligação de um oligonucleótido (através de uma ligação covalente do tipo presente nos conjugados aqui descritos) a uma molécula capaz de desempenhar a sua acção quando intercalada na hélice dupla de ADN (como por exemplo agentes antraciclinas antitumorais) permite dirigir a atrás referida actividade para regiões específicas do genoma.

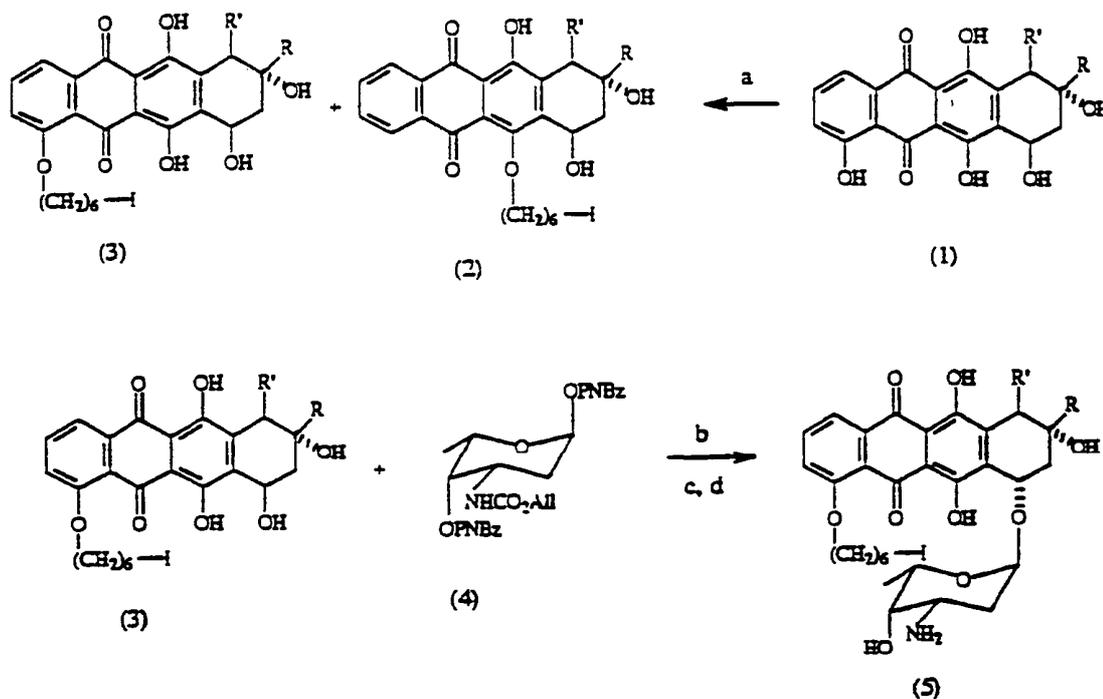
Este ataque selectivo permite atingir apenas os genes que são causa de doença. Como o local de acção dos novos produtos é sobre ADN, que é também a principal célula alvo destes agentes antitumorais, os conjugados de acordo com a invenção são úteis para dirigir especificamente estas drogas contra os oncogenes activados e contra o genoma proviral de um retrovírus, integrado no ADN do hospedeiro. Representam portanto um meio eficiente para dirigir drogas citotóxicas selectivamente para o alvo devido à sua complexação estável ao ADN na região específica.

TABELA 1

T_m (temperatura de 50% de dissociação)

Compostos	pH 5,5	pH 6,5	pH 6,8
6	55°C	43°C	31°C
7	51°C	35°C	27°C
8	55°C	45°C	36°C
9	45°C	25°C	16°C
10	41°C	23°C	13°C

ESQUEMA 1



em que

a = I-(CH₂)₆-I/Ag₂O

b = TMSOTf/CH₂Cl₂/Et₂O

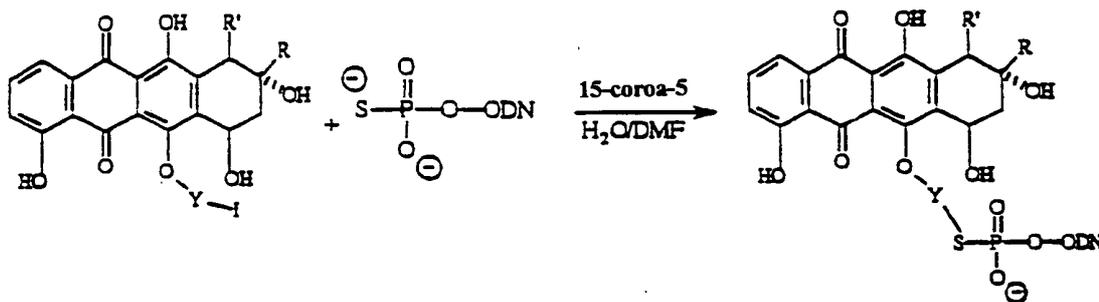
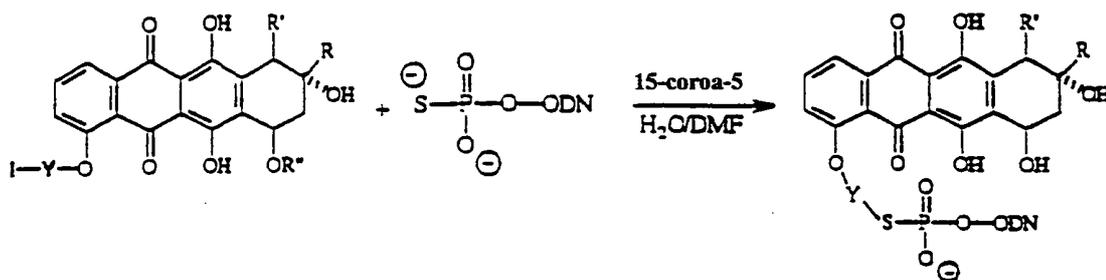
c = K₂CO₃ 0,5 M/MeOH

d = Pd(Ph₃P)₄/ácido 2-metilbutírico

R = COCH₃, COCH₂OH, COCH₂OAc, C₂H₅

R' = H, OH, COOCH₃

ESQUEMA 2



em que:

Y =

- (CH₂)₆-
- (CH₂)₁₂-
- (CH₂CH₂O-CH₂CH₂)-
- (CH₂CH₂NHCH₂CH₂)-



ODN =

5'GAGA₆(GA)₃
5'T₃CT₂CT₂CT₂
5'd(T₃C^{5Me}T₂C^{5Me}T₂C^{5Me}T₂)
5'T₂GTG₂TG₂T₂GTG₂
5'T₄C^{5Me}T₄G₆
5'TC^{5Me}₃T₆C^{5Me}TC^{5Me}
5'TGTGT₅GT₃GT₂T₄GT₃

R e R' são definidos como no ESQUEMA 1 e R'' = H, daunosamina.

(Segue Listagem de Sequências)



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE

- (A) NOME: CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
- (B) RUA: Piazzale Aldo Moro, 5
- (C) CIDADE: Rome
- (D) ESTADO: RM
- (E) PAÍS: ITÁLIA
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 00185
- (G) TELEFONE:
- (H) TELEFAX:

(ii) TÍTULO DO INVENTO: CONJUGADOS OLIGONUCLEÓTIDO-ANTRACICLINA
E OLIGONUCLEÓTIDO-ANTRACICLINONA

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 7

(iv) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: Compatível com PC da IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SUPORTE LÓGICO: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25 (EPO)

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

TTTCTTCTTC TT



(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

TTGTGGTGGT TGTGG

15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

GAGAAAAAAG

AGAGA

15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples



(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) CARACTERÍSTICA:

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: As bases de C nas posições 4, 7, 10 são metiladas

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

TTTCTTCTTC TT

12

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) CARACTERÍSTICA:

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: As bases de C nas posições 2, 4, 6, 13 e 15 são metiladas

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

TCTCTCTTTT TTCTC

15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

TGTGTTTTTG TTTGTTTTTT GTTT

24

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) CARACTERÍSTICA:

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: A base C na posição 5 é metilada

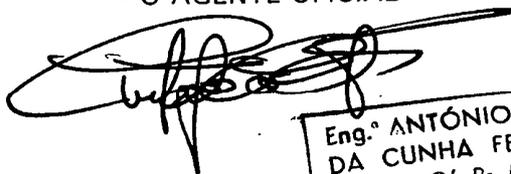
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

TTTTCTTTTG GGGGG

15

Lisboa, 1988

Por CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
- O AGENTE OFICIAL -



Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74-4.º
1200-195 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Conjugados que consistem em um oligonucleótido natural ou modificado capaz de formar um complexo em hélice tripla com um ADN de cadeia dupla, ligado, através de um ligante apropriado, à porção aglícica de uma antraciclina ou a uma antraciclina.
2. Conjugados de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido está ligado, através do ligante, ao anel D da antraciclina ou à aglícica.
3. Conjugados de acordo com a reivindicação 2 em que o oligonucleótido está ligado ao anel D na posição 4.
4. Conjugados de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido está ligado ao anel B da antraciclina ou aglícica.
5. Conjugados de acordo com a reivindicação 4 em que o oligonucleótido está ligado ao anel B na posição 6.
6. Conjugados de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido é um oligodesoxinucleótido.
7. Conjugados de acordo com a reivindicação 6 em que o oligonucleótido capaz de formar uma hélice tripla é seleccionado de entre o grupo que consiste em: 5'd(T₃CT₂CT₂CT₂); 5'd(T₂GTG₂TG₂T₂GTG₂); 5'd(GAGA₆(GA)₃); 5'd(TGTGT₅GT₃GT₂T₄GT₃); 5'd(TC^{5Me}₃T₆C^{5Me}TC^{5Me}); 5'd(T₃C^{5Me}T₂C^{5Me}T₂C^{5Me}T₂); 5'd(T₄C^{5Me}T₄G₆).
8. Conjugados de acordo com a reivindicação 1 em que o ligante é seleccionado de entre o grupo que consiste em: -(CH₂)_n-, -(CH₂-CH₂-O)_m-, -(CH₂-CH₂-CH₂-O)_p-, [(CH₂)_{2.5}-NH]_q-, [(CH₂)_{2.5}-S(O)₂]_q em que n é um número inteiro de 4 a 30, p é um número inteiro de 1 a 6, m e q, iguais ou diferentes, são números inteiros de 2 a 9.
9. Conjugados de acordo com a reivindicação 1 em que a antraciclina é uma antraciclina possuindo um grupo OH livre na posição 4 e/ou 6.

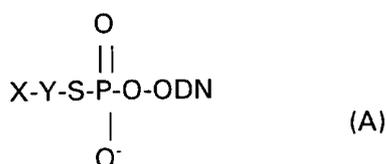
10. Conjugados de acordo com a reivindicação 9 em que a antraciclina é seleccionada de entre o grupo que consiste em: daunorubicina, doxorubicina, carminomicina (ou as correspondentes aglícicas), os correspondentes derivados 5-imino e os correspondentes derivados 3'-alfa-cianomorfolinilo.

11. Conjugados de acordo com a reivindicação 2 em que a aglícica é a aglícica de uma antraciclina de acordo com a reivindicação 8.

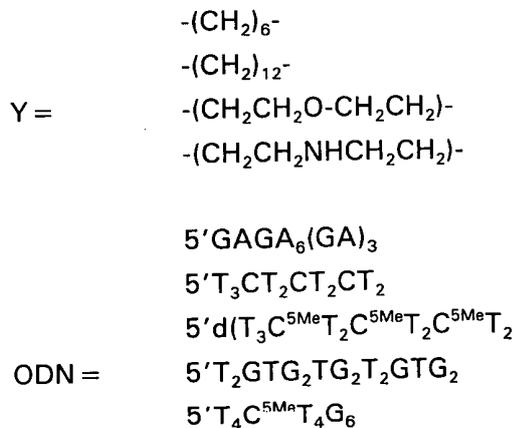
12. Conjugados de acordo com a reivindicação 2 em que a aglícica é a aglícica de uma antraciclina de acordo com a reivindicação 10.

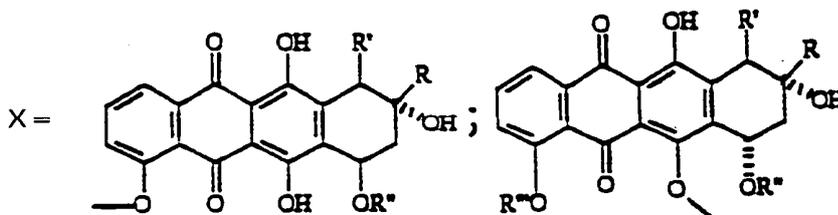
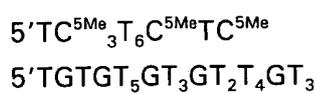
13. Conjugados de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido capaz de formar uma hélice tripla está ligado, através de dois ligantes colocados nas suas extremidades opostas, a duas moléculas de antraciclina (nas porções aglícicas) ou a duas moléculas de antraciclina, sendo estas antraciclina ou antraciclina iguais ou diferentes.

14. Conjugados de acordo com a reivindicação 1, esquematicamente representados pela fórmula A:



em que:

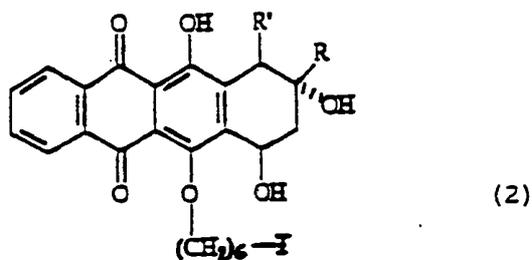




em que:

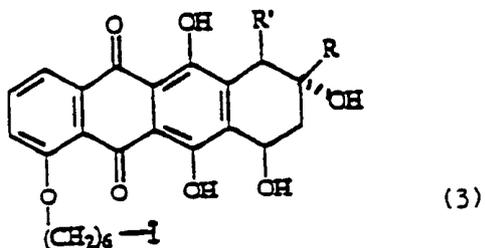
R = COCH₃, COCH₂OH, COCH₂OAc, C₂H₅; R' = H, OH, COOCH₃; R'' = H, daunosamina; R''' = H, CH₃.

15. Composto de fórmula geral (2):



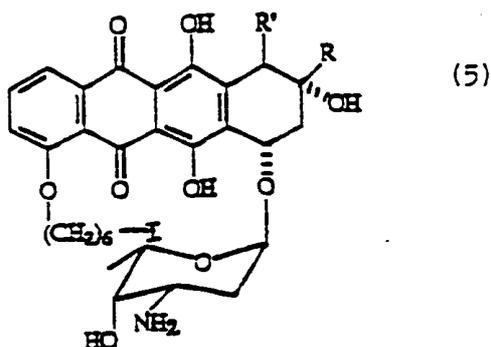
em que R e R' são definidos como na reivindicação 14.

16. Composto de fórmula geral (3):



em que R e R' são definidos como na reivindicação 14.

17. Composto de fórmula geral (5):



em que R e R' são definidos como na reivindicação 14.

Lisboa, 17 NOV 2001

Por CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
- O AGENTE OFICIAL -

Eng. ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74-4.º
1200-195 LISBOA