

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 240**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06	(2006.01)	C07K 16/28	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)		
A61K 31/4745	(2006.01)		
A61K 31/573	(2006.01)		
A61K 31/475	(2006.01)		
A61K 31/337	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61K 31/575	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2006 E 06838847 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 1971371**

54 Título: **Terapias para el cáncer y composiciones farmacéuticas usadas en las mismas**

30 Prioridad:

01.12.2005 US 741229 P
02.03.2006 US 778304 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2015

73 Titular/es:

PRONAI THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4717 CAMPUS DRIVE SUITE 1100
KALAMAZOO MI 49008, US

72 Inventor/es:

GOODWIN, NEAL CLIFFORD y
MC GOVREN, JAMES PATRICK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 548 240 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

Terapias para el cáncer y composiciones farmacéuticas usadas en las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a terapias para el cáncer. En particular, la presente invención proporciona terapias para el cáncer combinadas que comprenden oligómeros y otro agente terapéutico.

10 **Antecedentes de la invención**

Los oncogenes se han convertido en el concepto central en el entendimiento de la biología del cáncer y pueden proporcionar dianas valiosas para fármacos terapéuticos. En muchos tipos de tumores humanos, incluyendo linfomas y leucemias, los oncogenes se sobreexpresan y pueden asociarse con la tumorigenicidad (Tsujiimoto *et al.*, Science 228:1440-1443 [1985]). Por ejemplo, se han descubierto niveles altos de expresión del gen bcl-2 humano en todos los linfomas con translocaciones cromosómicas t(14; 18), incluyendo la mayoría de los linfomas foliculares de células B y muchos linfomas macrocíticos no Hodgkin. También se han encontrado altos niveles de expresión génica de bcl-2 en determinadas leucemias que no tienen la translocación cromosómica t(14; 18), incluyendo la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica aguda, muchas leucemias linfocíticas del tipo de célula pre-B, neuroblastomas, carcinomas nasofaríngeos, y muchos adenocarcinomas de próstata, mama y colon. Reed *et al.*, Cancer Res. 51:6529 [1991]; Yunis *et al.*, New England J. Med. 320:1047; Campos *et al.*, Blood 81:3091-3096 [1993]; McDonnell *et al.*, Cancer Res. 52:6940-6944 [1992]; Lu *et al.*, Int. J Cancer 53:29-35 [1993]; Bonner *et al.*, Lab Invest. 68:43A [1993]. Otros oncogenes incluyen TGF- α , *c-ki-ras*, *ras*, *her-2* y *c-myc*.

25 La expresión génica, incluyendo la expresión de oncogenes, puede inhibirse mediante moléculas que interfieren con la función promotora. Por consiguiente, la expresión de los oncogenes puede inhibirse mediante oligonucleótidos monocatenarios.

30 El tratamiento contra el cáncer incluye normalmente agentes quimioterapéuticos y a menudo radioterapia. En muchos casos, sin embargo, los tratamientos actuales no son eficaces o no curan el cáncer. Por consiguiente, hay una necesidad de tratamientos para el cáncer más efectivos.

Sumario de la invención

35 La invención se refiere a terapias combinadas para tratar el cáncer, en particular, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un oligonucleótido y un agente quimioterapéutico, en las que el oligonucleótido comprende la SEC ID N°: 1251 o el complemento del mismo. Además, la invención se refiere a una composición para su uso en un método para tratar el cáncer.

40 Además se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto oligonucleotídico y un agente quimioterapéutico, en la que el compuesto oligonucleotídico es un oligómero que hibrida en condiciones fisiológicas con la SEC ID N°: 1249 o con complemento de la misma. En una realización, el agente de quimioterapia comprende un anti-metabolito. El anti-metabolito puede incluir metotrexato, 5-fluorouracilo, gemcitabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, cladribina, citarabina o combinaciones de los mismos.

45 En otra realización, el agente quimioterapéutico comprende una antraciclina. La antraciclina puede comprender daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, mitoxantrona o combinaciones de los mismos.

50 En otra realización más, el agente quimioterapéutico comprende un taxano. El taxano puede incluir paclitaxel, docetaxel, Taxotere™, Taxol o combinaciones de los mismos.

En otra realización más, el agente quimioterapéutico comprende una camptotecina. La camptotecina puede incluir irinotecán, topotecán, etopósido, vincristina, vinblastina, vinorelbina, o combinaciones de los mismos.

55 En otra realización más, el agente quimioterapéutico comprende un inhibidor de EGFR. El inhibidor de EGFR puede incluir gefitinib, erlotinib, cetuximab o combinaciones de los mismos.

En otra realización más, el agente quimioterapéutico comprende una o más inmunoterapias. Las inmunoterapias pueden incluir rituximab, tositumomab, ibritumomab, bevacizumab o combinaciones de los mismos.

60 En una realización adicional, el agente quimioterapéutico comprende uno o más inhibidores de quinasas. El inhibidor de tirosina quinasa puede incluir mesilato de imatinib, lefunomida y midostaurina.

65 En una realización adicional, el agente quimioterapéutico comprende un cóctel que incluye una inmunoterapia, un agente alquilante, una antraciclina, una camptotecina y prednisona. La inmunoterapia puede incluir rituximab, el agente alquilante puede incluir ciclofosfamida, la antraciclina puede incluir doxorubicina y la camptotecina puede

incluir vincristina.

Además se describe que el oligómero puede comprender un oligómero que hibrida en condiciones fisiológicas con los nucleótidos 500-2026, 500-1525, 800-1225, 900-1125, 950-1075 o 970-1045 de la SEC ID N°: 1249 o el complemento de la misma. En otra realización más, el oligómero puede comprender la SEC ID N°: 1250, 1251 o los complementos de las mismas.

En otra realización, el oligómero incluye un oligómero adicional. El oligómero adicional puede incluir una cualquiera de las SEC ID N°: 1250-1253, 1267-1477, 2-281, 283-461, 463-935, 937-1080, 1082-1248 y los complementos de las mismas.

En otra realización más, los oligonucleótidos son de entre 15 y 35 pares de bases de longitud. En otra realización más, los oligonucleótidos tienen una estructura de fosforotioato.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar el cáncer que incluye administrar a un paciente una cantidad eficaz de un compuesto oligonucleotídico y administrar al paciente una cantidad efectiva de un agente quimioterapéutico.

Una realización de este aspecto incluye agentes quimioterapéuticos que incluyen un cóctel que tiene Rituximab, Ciclofosfamida, una antraciclina, una camptotecina y Prednisona. En otra realización, el agente quimioterapéutico comprende rituximab. Otra realización incluye además administrar al paciente radioterapia. Otra realización incluye además extirpar tejido canceroso de un paciente.

En el presente documento se describe un compuesto oligonucleotídico que puede incluir cualquier oligómero que hibride en condiciones fisiológicas con la SEC ID N°: 1249, SEC ID N°: 936 o el complemento de las mismas. Otra realización incluye un oligómero que hibrida en condiciones fisiológicas con los nucleótidos 500-2026, 500-1525, 800-1225, 900-1125, 950-1075 o 970-1045 de SEC ID N°: 1249 o el complemento de la misma. Otra realización más incluye un oligómero seleccionado entre las SEC ID N°: 1250, 1251, 1252, 1253, 1267-1477, 2-281, 283-461, 463-935, 937-1080, 1082-1248 y los complementos de las mismas.

En otra realización, el método incluye además administrar un oligómero adicional. El oligómero adicional puede comprender una cualquiera de las SEC ID N°: 1250-1253, 1267-1477, 2-281, 283-461, 463-935, 937-1080, 1082-1248 y los complementos de las mismas.

En otra realización más, los oligonucleótidos son de entre 15 y 35 pares de bases de longitud. En otra realización más, los oligonucleótidos tienen una estructura de fosforotioato.

En un tercer aspecto, la invención proporciona la SEC ID N°: 1251 para su uso en un método para tratar el cáncer que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto oligonucleotídico que incluye la SEC ID N°: 1251 y administrar al paciente una cantidad eficaz de rituximab.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el volumen tumoral medio de tumores en el modelo subcutáneo de carcinoma de próstata PC-3 GFP después de tratamiento con la SEC ID N°: 1251 y Taxotere™.

La Figura 2 muestra el volumen tumoral final medio de tumores en el modelo subcutáneo de carcinoma de próstata PC-3 GFP después del tratamiento con la SEC ID N°: 1251 y Taxotere™.

La Figura 3 muestra el aumento porcentual en el tamaño tumoral en xenoinjertos de PC-3 después del tratamiento con SEC ID N°: 1251 y Taxotere™.

La Figura 4 muestra la respuesta de tumores PC-3 en ratones a PNT-100 liposomal y docetaxel.

La Figura 5 muestra la respuesta de tumores PC-3 en ratones a PNT-100 liposomal y docetaxel administrados mediante inyección i.v en embolada.

La Figura 6 muestra la respuesta de tumores PC-3 en ratones a PNT-100 liposomal y docetaxel administrados mediante inyección i.v. en embolada e infusión lenta.

La Figura 7 muestra la respuesta de xenoinjertos de Daudi a PNT-100 y rituximab.

La Figura 8 muestra una representación de Kaplan-Meier de la respuesta de los xenoinjertos de Daudi a PNT-100 y rituximab.

La Figura 9 muestra el cambio en el peso corporal de ratones que portan xenoinjertos de Daudi tratados con PNT-100 y/o rituximab.

Descripción detallada

I. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, un "agente terapéutico" es un fármaco citotóxico no basado en oligonucleótidos o un cóctel de fármacos citotóxicos no basado en oligonucleótidos que están pensados para

destruir o inhibir células y tejidos malignos.

Tal como se usa en el presente documento, "paciente" se refiere a un mamífero, incluyendo un ser humano.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento particular. Normalmente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "animales no humanos" se refiere a todos los animales no humanos incluyendo, pero sin limitación, vertebrados tales como roedores, primates no humanos, ovinos, bovinos, rumiantes, lagomorfos, porcinos, caprinos, equinos, caninos, felinos, aves, etc. y animales no vertebrados tales como drosophila y nematodos.

15 Tal como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz se define como la cantidad necesaria para conferir un efecto terapéutico al paciente tratado, y se determina normalmente basándose en la edad, área superficial, peso y estado del paciente. La interrelación de dosificaciones para animales y seres humanos (basándose en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) se describe por Freireich *et al.*, Cancer Chemother. Rep., 50: 219 (1966). El área de superficie corporal puede determinarse aproximadamente a partir de la altura y peso del paciente. Véase, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, New York, 537 (1970).

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "donde dicho agente quimioterapéutico está presente a menos de la mitad de la dosis convencional" se refiere a una dosificación que es menos de la mitad (por ejemplo, menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 10 % o menos del 1 %) del valor mínimo del intervalo de dosificación convencional usado para la dosificación en seres humanos. En algunas realizaciones, el intervalo de dosificación estándar es el intervalo de dosificación recomendado por el fabricante. En otras realizaciones, el intervalo de dosificación estándar es el intervalo utilizado por un doctor en medicina experto. En otras realizaciones más, el intervalo de dosificación estándar es el intervalo considerado el estándar de cuidado normal en la técnica. La dosificación particular dentro del intervalo de dosificación se determina, por ejemplo, mediante la edad, peso, y salud del sujeto así como el tipo de cáncer que se esté tratando.

35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "en condiciones tales que la expresión de dicho gen se inhibe" se refiere a condiciones en las que un oligonucleótido de la presente invención híbrida con un gen (por ejemplo, una región reguladora del gen) e inhibe la transcripción del gen en al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 % o al menos un 90 % en relación al nivel de transcripción en ausencia del oligonucleótido. La presente invención no está limitada a la inhibición de la expresión de un gen particular. Los genes ejemplares incluyen, sin limitación *c-kí-ras*, *c Ha-ras*, *c-myc*, *her-2*, *TGF- α* , y *bcl-2*.

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "en condiciones tales que el crecimiento de dicha célula se reduce" se refiere a condiciones donde un oligonucleótido de la presente invención, cuando se administra a una célula (por ejemplo, un cáncer) reduce la velocidad de crecimiento de la célula en al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 % o al menos un 90 % en relación con la velocidad de crecimiento de la célula en ausencia del oligonucleótido.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula que contenga ácido nucleico incluyendo, pero sin limitación, ADN o ARN. La expresión abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN.

50 El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede codificarse por una secuencia codificante de longitud completa o mediante cualquier porción de la secuencia codificante siempre que se conserve la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señales, inmunogenicidad, etc.) de la longitud completa o de los fragmentos. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en los extremos tanto 5' como 3' durante una distancia de aproximadamente 1 kb o más de cualquier extremo, de tal forma que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en posición 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se citan como secuencias 5' no traducidas. Las secuencias ubicadas en posición 3' o cadena abajo de la región codificante y presentes en el ARNm se citan como secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto ADNc como formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intercalantes" o "secuencias intercalantes". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o "cortan" del transcrito nuclear o primario; los intrones, por lo tanto, están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u orden de aminoácidos en un polipéptido naciente.

Tal como se usa en el presente documento, la “región reguladora” de un gen es cualquier parte de un gen que regula la expresión de un gen incluyendo, sin limitación, la regulación transcripcional y traduccional. Las regiones incluyen, sin limitación, las regiones 5' y 3' de genes, sitios de unión para factores reguladores, incluyendo sin limitación sitios de unión de factores de transcripción. Las regiones también incluyen regiones que tienen 20.000 o más pares de bases cadena arriba o cadena debajo de los sitios de inicio de la traducción, en tanto que la región esté implicada de algún modo en la regulación de la expresión del gen. La región puede ser tan corta como 20 pares de bases o tan larga como cientos de pares de bases.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “gen heterólogo” se refiere a un gen que no está en su ambiente natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducida en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo para un organismo que se ha alterado de algún modo (por ejemplo, mutado, añadido en múltiples copias, unido a secuencias reguladoras no nativas, etc.). Los genes heterólogos se distinguen de los genes endógenos en que las secuencias génicas heterólogas están normalmente unidas a secuencias de ADN que no se encuentran naturalmente asociadas con las secuencias génicas en el cromosoma o están asociadas con porciones del cromosoma no encontradas en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en loci donde el gen no se expresa normalmente).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “expresión génica” se refiere al proceso de convertir la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, o ARNsn) mediante “transcripción” del gen (es decir, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa) y, en el caso de genes codificantes de proteínas, en proteínas mediante “traducción” de ARNm. La expresión génica puede regularse en muchos estados del proceso. “La regulación positiva” o “activación” se refiere a la regulación que aumenta la producción de productos de expresión génica (es decir, ARN o proteína), mientras que la “regulación negativa” o “represión” se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están implicados en la regulación positiva o regulación negativa se denominan normalmente “activadores” y “represores”, respectivamente.

Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas en los extremos tanto 5' como 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se citan como secuencias o regiones “flanqueantes” (estas secuencias flanqueantes se localizan en posición 5' o 3' con respecto a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región flanqueante 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y potenciadores que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la escisión post-transcripcional y la poliadenilación.

La expresión “tipo silvestre” se refiere a un gen o producto génico aislado de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre es aquel que se observa más frecuentemente en una población y, por lo tanto, se denomina de manera arbitraria la forma del gen “normal” o “de tipo silvestre”. Por el contrario, el término “modificado” o “mutante” se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico de tipo silvestre. Se ha notificado que pueden aislarse mutantes de origen natural; éstos se identifican mediante el hecho de que tienen características alteradas (incluyendo secuencias de ácido nucleico alteradas) cuando se comparan con el gen o producto génico de tipo silvestre.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones “un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen” y “polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen”, significan una secuencia de ácido nucleico que comprende la región codificante de un gen o, en otras palabras, la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico. La región codificante puede estar presente en una forma de ADNc, ADN genómico o de ARN. Cuando está presente en forma de ADN, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario (es decir, la hebra con sentido) o bicatenario. Pueden situarse elementos de control adecuados tales como potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme, señales de poliadenilación, etc. en estrecha proximidad con la región codificante del gen en caso necesario para permitir la iniciación adecuada de la transcripción y/o el procesamiento correcto del transcrito de ARN primario. Como alternativa, la región codificante utilizada en los vectores de expresión de la presente invención puede contener potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme, secuencias intercalantes, señales de poliadenilación, etc. endógenas o una combinación de elementos de control tanto endógenos como exógenos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “oligonucleótido” se refiere a un trozo pequeño de una cadena polinucleotídica monocatenaria. Los oligonucleótidos son normalmente de menos de 200 restos de longitud (por ejemplo, entre 8 y 100), sin embargo, tal como se usa en el presente documento, el término también pretende abarcar cadenas polinucleotídicas mayores (por ejemplo, tan grandes como de 5000 restos). Los oligonucleótidos a menudo se citan por su longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido de 24 restos se cita como un “24-mero”. Los oligonucleótidos pueden formar estructuras secundarias y terciarias hibridando consigo mismos o con otros polinucleótidos. Dichas estructuras pueden incluir, pero sin limitación, dúplex, horquillas, cruciformas, giros y tríplex.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos son “antígenos”. Tal como se usa en el presente documento, el término “antígeno” se refiere a un oligonucleótido que hibrida con la región promotora de un gen. En algunas realizaciones, la hibridación del antígeno con el promotor inhibe la expresión del gen.

5 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “complementario” o “complementariedad” se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados mediante las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, para la secuencia “A-G-T” es complementaria la secuencia “T-C-A”. La complementariedad puede ser “parcial”, en tanto que solo algunas de las bases de ácido nucleico están emparejadas de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O puede haber una complementariedad
10 “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y fuerza de la hibridación entre hebras de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “completamente complementario”, por ejemplo cuando se usa en referencia a un oligonucleótido de la presente invención, se refiere a un oligonucleótido donde todos los nucleótidos son complementarios a una secuencia diana (por ejemplo, un gen).

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “parcialmente complementarios”, por ejemplo cuando se usa en referencia a un oligonucleótido de la presente invención, se refiere a un oligonucleótido donde al menos un nucleótido no es complementario a la secuencia diana. Los oligonucleótidos parcialmente complementarios ejemplares son aquellos que pueden todavía hibridar con la secuencia diana en condiciones fisiológicas. La expresión “parcialmente complementario” se refiere a oligonucleótidos que tienen regiones de uno o más nucleótidos no complementarios tanto internos en el oligonucleótido como en cualquier extremo. Los oligonucleótidos con
25 desemparejamiento en los extremos siguen pudiendo hibridar con la secuencia diana.

El término “homología” se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una molécula de ácido nucleico que inhibe al menos parcialmente la hibridación de una molécula de ácido nucleico completamente complementaria a un
30 ácido nucleico diana que es “sustancialmente homólogo”. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria a la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia de Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia sustancialmente homóloga o sonda competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente homóloga a una diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no
35 quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de las dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede ensayarse mediante el uso de una segunda diana que sea sustancialmente no complementaria (por ejemplo, menos de aproximadamente un 30 % de identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no hibridará con la segunda diana no complementaria.

40 Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico bicatenaria, tal como un ADNc o clon genómico, la expresión “sustancialmente homóloga” se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con una o ambas hebras de la secuencia de ácido nucleico bicatenaria en condiciones de baja rigurosidad tal como se ha descrito anteriormente.

45 Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico monocatenaria, la expresión “sustancialmente homólogo” se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con (es decir, es el complemento de) la secuencia de ácido nucleico monocatenaria en condiciones de baja rigurosidad tal como se ha descrito anteriormente.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “hibridación” se usa en referencia al emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ve afectada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la T_m del híbrido formado, y la relación G:C en los ácidos nucleicos. Una sola molécula que contenga emparejamientos de ácidos nucleicos complementarios en su estructura se dice que está “auto-hibridada”.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “ T_m ” se usa en referencia a la “temperatura de fusión”. La temperatura de fusión es la temperatura a la que la población de moléculas de ácido nucleico bicatenarias se semi-disocia en hebras individuales. La ecuación para calcular la T_m de los ácidos nucleicos se conoce bien en la técnica. Tal como se indica mediante las referencias convencionales, puede calcularse una estimación simple del valor de T_m
60 mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ de } G + C)$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa con NaCl 1 M (véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization, en Nucleic Acid Hybridization [1985]). Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados que tienen en cuenta características estructurales así como de secuencia para el cálculo del valor de T_m .

65 Tal como se usa en el presente documento, “rigurosidad” se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica, y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, en las que se llevan a cabo las

5 hibridaciones de ácido nucleico. En “condiciones de baja rigurosidad”, una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará con su complemento exacto, secuencias con desemparejamientos de una sola base, secuencias estrechamente relacionadas (por ejemplo, secuencias con una homología del 90 % o mayor), y secuencias que tienen solo homología parcial (por ejemplo, secuencias con una homología del 50-90 %). En “condiciones de rigurosidad media”, una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará solo con su complemento exacto, secuencias con desemparejamientos de una sola base, y secuencias estrechamente relacionadas (por ejemplo, una homología del 90 % o mayor). En “condiciones de alta rigurosidad”, una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará únicamente con su complemento exacto y (dependiendo de condiciones tales como la temperatura), con secuencias con desemparejamientos de una sola base. En otras palabras, en condiciones de alta rigurosidad, la temperatura puede estar elevada para excluir la hibridación de secuencias con desemparejamientos de una sola base.

15 Las “condiciones de alta rigurosidad”, cuando se usan en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en SSPE 5X (NaCl 43,8 g/l, NaH₂PO₄ H₂O 6,9 g/l y EDTA 1,85 g/l, ajustándose el pH a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5 %, reactivo de Denhardt 5X y ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 100 µg/ml seguido de lavado en una solución que comprende SSPE 0,1X, SDS al 1,0 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

20 Las “condiciones de rigurosidad media”, cuando se usan en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en SSPE 5X (NaCl 43,8 g/l, NaH₂PO₄ H₂O 6,9 g/l y EDTA 1,85 g/l, ajustándose el pH a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5 %, reactivo de Denhardt 5X y ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 100 µg/ml seguido de lavado en una solución que comprende SSPE 1,0X, SDS al 1,0 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

30 Las “condiciones de baja rigurosidad” comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en SSPE 5X (NaCl 43,8 g/l, NaH₂PO₄ H₂O 6,9 g/l y EDTA 1,85 g/l, ajustándose el pH a 7,4 con NaOH), SDS al 0,1 %, reactivo de Denhardt 5X [Denhardt 50X contiene por cada 500 ml: 5 g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (Fracción V; Sigma)] y ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 100 µg/ml seguido de lavado en una solución que comprende SSPE 5X, SDS al 1,0 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

35 La presente invención no está limitada a la hibridación de sondas de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. La presente invención contempla el uso de sondas de entre aproximadamente 8 nucleótidos hasta varios cientos (por ejemplo, al menos 5000) nucleótidos de longitud. Un experto en la materia entiende que las condiciones de rigurosidad pueden alterarse para sondas de otros tamaños (véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization, en Nucleic Acid Hybridization [1985] y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y Current Protocols in Molecular Biology, M. Ausubel *et al.*, eds., (Current Protocols, un proyecto común entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., y los suplementos hasta 2006).

45 Se sabe bien en la técnica que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes que comprenden condiciones de baja rigurosidad; se tienen en consideración factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en solución o inmovilizada, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y la solución de hibridación puede variarse para generar condiciones de baja rigurosidad de hibridación diferentes de, pero equivalentes a, las condiciones anteriormente indicadas. Además, se conocen en la técnica condiciones que promueven la hibridación en condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, el aumento de la temperatura de hibridación y/o etapas de lavado, el uso de formamida en la solución de hibridación, etc.) (De nuevo véase la definición anterior para “rigurosidad”).

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones fisiológicas” se refiere a condiciones de rigurosidad específicas que se aproximan o son condiciones de dentro de un animal (por ejemplo, un ser humano). Las condiciones fisiológicas ejemplares para su uso *in vitro* incluyen, pero sin limitación, 37 °C, aire al 95 %, CO₂ al 5 %, medio comercial para el cultivo de células de mamífero (por ejemplo, medio DMEM disponible a través de Gibco, MD), suero al 5-10 % (por ejemplo, suero de ternera o suero de caballo), tampones adicionales y opcionalmente hormonas (por ejemplo, insulina y factor de crecimiento epidérmico).

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado”, cuando se usa en relación a un ácido nucleico, tal como en “un oligonucleótido aislado” o “polinucleótido aislado” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está identificada y separada de al menos un componente o contaminante con el que normalmente se asocia habitualmente en su fuente natural. El ácido nucleico aislado por lo tanto está presente en una forma o configuración que es diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos tales como ADN y ARN encontrados en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula hospedadora en

proximidad a genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula en forma de una mezcla con numerosos otros ARNm que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína dada incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que normalmente expresan la proteína dada en los casos en los que el ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales, o está de otro modo flanqueado por una secuencia de ácido nucleico diferente de la que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado se va a utilizar para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la hebra con sentido o codificante (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener tanto la hebra con sentido como la anti-sentido (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

Tal como se usa en el presente documento, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la retirada de componentes (por ejemplo, contaminantes) de una muestra. Por ejemplo, los polipéptidos recombinantes se expresan en células bacterianas hospedadoras y los polipéptidos se purifican mediante la retirada de las proteínas de célula hospedadora; el porcentaje de polipéptidos recombinantes aumenta de este modo en la muestra.

El término “epítipo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la porción de un antígeno que hace contacto con un anticuerpo particular.

Cuando una proteína o un fragmento de una proteína se usan para inmunizar a un animal hospedador, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región dada o estructura tridimensional en la proteína; estas regiones o estructuras se citan como “determinantes antigénicos”. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el “inmunógeno” usado para provocar la respuesta inmunitaria) por la unión a un anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “transferencia de western” se refiere al análisis de proteínas (o polipéptidos) inmovilizados sobre un soporte sólido tal como nitrocelulosa o una membrana. Las proteínas se hacen correr en geles de acrilamida para separar las proteínas, seguido de transferencia de la proteína del gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nailon. Las proteínas inmovilizadas después se exponen a anticuerpos con reactividad contra un antígeno de interés. La unión de los anticuerpos puede detectarse mediante diversos métodos, incluyendo el uso de anticuerpos radiomarcados.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “cultivo celular” se refiere a cualquier cultivo de células *in vitro*. En este término se incluyen líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas) y cualquier otra población de células mantenida *in vitro*.

Tal como se usa, el término “eucariota” se refiere a organismos distinguibles de los “procariotas”. Se pretende que el término abarque todos los organismos con células que muestren las características habituales de los eucariotas, tales como la presencia de un núcleo verdadero rodeado por una membrana celular, dentro del cual se encuentran los cromosomas, la presencia de orgánulos unidos a membrana, y otras características observadas de manera común en los organismos eucariotas. Por lo tanto el término incluye, pero sin limitación, organismos tales como hongos, protozoos y animales (por ejemplo, seres humanos).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “*in vitro*” se refiere a un ambiente artificial y a procesos o reacciones que suceden en un ambiente artificial. Los ambientes *in vitro* pueden consistir en, pero sin limitación, tubos de ensayos y cultivo celular. La expresión “*in vivo*” se refiere al ambiente natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que suceden en un ambiente natural.

Las expresiones “compuesto de ensayo” y “compuesto candidato” se refieren a cualquier entidad química, agente farmacéutico, fármaco y similares que sea un candidato para su uso para tratar o prevenir una enfermedad, indisposición, dolencia, o trastorno de una función corporal (por ejemplo, cáncer). Los compuestos de ensayo comprenden compuestos terapéuticos tanto conocidos como potenciales. Puede determinarse si un compuesto de ensayo es terapéutico mediante exploración usando los métodos de exploración de la presente invención. En algunas realizaciones de la presente invención, los compuestos de ensayo incluyen compuestos antisentido.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “agentes quimioterapéuticos” se refiere a compuestos que son útiles en el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, cáncer). Los agentes quimioterapéuticos ejemplares efectivos contra el cáncer incluyen, pero sin limitación, daunorubicina, dactinomicina, doxorubicina, bleomicina, mitomicina, mostaza de nitrógeno, clorambucilo, melfalano, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina (CA), 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, vincristina, vinblastina, etopósido, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES).

Tal como se usa el presente documento, el término “muestra” se usa en su sentido más amplio. En un sentido, significa que incluye un espécimen o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y

ambientales. Las muestras biológicas pueden obtenerse de animales (incluyendo seres humanos) y abarcan fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos de la sangre tales como plasma, suero y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia de la superficie, suelo, agua, cristales y muestras industriales. Sin embargo, dichos ejemplos no deben entenderse como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente invención. A menos que se indique lo contrario, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención se encuentran dentro del alcance de la invención. Además, a menos que se afirme lo contrario, las estructuras ilustradas en el presente documento también pretenden incluir compuestos que difieren únicamente en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por el reemplazo de hidrógeno por deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C se encuentran dentro del alcance de esta invención. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas o sondas en ensayos biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, las terapias conjuntas incluyen cualquier compuesto oligonucleotídico que puede usarse solo o en combinación con otras terapias para el cáncer para tratar el cáncer.

II. Terapias para el cáncer

Las terapias para el cáncer de la presente invención incluyen compuestos oligonucleotídicos, agentes quimioterapéuticos, radioterapia, cirugía o combinaciones de los mismos.

A. Compuestos oligonucleotídicos

1. Dianas de oncogén

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona inhibidores antígenos de oncogenes. La presente invención no se limita a la inhibición de un oncogén particular. De hecho, la presente invención abarca antígenos inhibidores para cualquier número de oncogenes incluyendo, pero sin limitación, aquellos divulgados en el presente documento.

a. Ras

Un gen que ha captado la atención de muchos científicos es el proto-oncogén humano *c-Ha-ras*. Este gen actúa como un distribuidor central, retransmitiendo señales químicas a células y controlando la división celular. La alteración del gen ras puede hacer que el gen se quede en la posición de "encendido". Se cree que el oncogén *ras* está detrás de hasta un 30 % de los cánceres, incluyendo el cáncer de colon, cáncer de pulmón, carcinoma de vejiga y mamario (Bos, Cancer Res. 49: 4682-4689 [1989]). El oncogén *ras*, por lo tanto, se ha convertido en una diana para fármacos terapéuticos.

Hay varios informes que demuestran que los oligonucleótidos complementarios a diversos sitios del ARNm de *ras* pueden inhibir la síntesis de la proteína ras (p21), lo cual disminuye la velocidad de proliferación en cultivo celular (Patente de Estados Unidos N° 5.576.208; Patente de Estados Unidos N° 5.582.986; Daska *et al.*, Oncogene Res. 5: 267-275 [1990]; Brown *et al.*, Oncogene Res. 4: 243-252 [1989]; Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J. 10: 1111-1116 [1991]). Se ha demostrado que oligonucleótidos complementarios a la región flanqueante 5' del transcrito de ARN de *c-Ha-ras* inhiben el crecimiento tumoral en ratones desnudos durante hasta 14 días (Gray *et al.*, Cancer Res. 53: 577-580 [1993]). Recientemente se comunicó que un oligonucleótido antisentido dirigido a una mutación puntual (G>C) en el codón 12 del ARNm de *c-Ha-ras* inhibió la proliferación celular así como el crecimiento tumoral en ratones desnudos cuando se inyectó por vía subcutánea (Patente de Estados Unidos N° 5.576.208; Patente de Estados Unidos N° 5.582.986; Schwab *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10460-10464 [1994]; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia). Los investigadores también han comunicado que determinados fármacos antisentido encogieron tumores ováricos en ensayos clínicos pequeños (Roush *et al.*, Science 276:1192-1194 [1997]).

b. her-2

El oncogén *her-2* (también conocido como oncogén neu o erbB-2) codifica una tirosina quinasa de tipo receptor (RTK) que se ha investigado extensivamente debido a su papel en varios carcinomas humanos (Hynes y Stern, Biochim. et Biophys. Acta 1198: 165-184 [1994]; Dougall *et al.*, Oncogene 9: 2109-2123 [1994]) y en el desarrollo de mamíferos (Lee *et al.*, Nature 378: 394-398 [1995]). La secuencia de la proteína HER-2 se determinó a partir de un ADNc que se clonó mediante homología con el ARNm del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) procedente de la placenta (Coussens *et al.*, Science 230: 1132-1139 [1985]) y procedente de una línea celular de carcinoma gástrico (Yamamoto *et al.*, Nature 319: 230-234 [1986]). Se ha demostrado que el ARNm de *her-2* es de aproximadamente 4,5 kb (Coussens *et al.*, Science 230: 1132-1139 [1985]; Yamamoto *et al.*, Nature 319: 230-234 [1986]) y codifica una glucoproteína transmembrana de 185 kDa en tejidos humanos normales y malignos (p185HER-2) (Hynes y Steen, Biochim. et Biophys. Acta 1198: 165-184 [1994]; Dougall *et al.*, Oncogene 9: 2109-2123 [1994]). La sobreexpresión de HER-2 provoca la transformación fenotípica de células cultivadas (DiFiore *et al.*, Science 237: 178-182 [1987]; Hudziak *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7159-7163 [1987]) y se ha asociado con

una progresión clínica agresiva de cáncer de mama y de ovarios (Slamon *et al.*, Science 235: 177-182 [1987]; Slamon *et al.*, Science 244: 707-712 [1989]).

5 *Her-2* es uno de los genes más frecuentemente alterados en el cáncer. Codifica un receptor transmembrana (también conocido como p185) con la actividad de tirosina quinasa y es un miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y, por lo tanto, está relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER-1). La expresión génica aberrante de *her-2* está presente en una gran variedad de cánceres y es más común en cánceres de mama, ovarios y gástricos. HER-2 se sobreexpresa en un 25-30 % de todos los cánceres de mama y de ovario humanos. Los niveles de sobreexpresión de HER-2 se correlacionan con el estado clínico del
10 cáncer de mama, su pronóstico y su potencial metastásico. La sobreexpresión de HER-2 se asocia con tasas menores de supervivencia, aumento de tasas de recaída y un potencial metastásico aumentado. Tan *et al.*, (Cancer Res., 57: 1199 [1997]) han demostrado que la sobreexpresión del gen de HER-2 aumenta el potencial metastásico de las células de cáncer de mama sin aumentar su capacidad de transformación.

15 La expresión aberrante de HER-2 incluye tanto la expresión aumentada de HER-2 como la expresión de HER-2 mutante. La activación del proto-oncogén de *her-2* puede producirse mediante cualquiera de tres mecanismos: mutación puntual, amplificación génica y sobreexpresión. La amplificación génica es el mecanismo más común. A diferencia de los otros miembros de la familia de EGF para los cuales la activación de ligando es necesaria para promover la transformación, la sobreexpresión de HER-2 solo es suficiente para la transformación (Cohen, *et al.*, J. Biol. Chem., 271: 30897 [1996]).
20

Se han usado varias estrategias terapéuticas para reducir los niveles del producto génico HER-2. El producto génico E1A de adenovirus de tipo 5 se ha estudiado como un agente terapéutico potencial usando un modelo de cáncer de mama en ratones desnudos. Este producto génico puede reprimir la sobreexpresión de HER-2/*neu* reprimiendo la
25 actividad del promotor de *her-2/neu*, y suprimir el potencial tumorigénico de células de cáncer de ovario que sobreexpresan HER-2/*neu*. En ratones que portan xenoinjertos de cáncer de mama que sobreexpresan HER-2/*neu*, E1A administrado bien mediante adenovirus o liposomas inhibió de manera significativa el crecimiento tumoral y prolongó la supervivencia de los ratones en comparación con los controles (Chang *et al.*, Oncogene 14:561 [1997]).

30 Se han llevado a cabo ensayos clínicos para evaluar un anticuerpo biespecífico que se dirige a los dominios extracelulares tanto del producto proteínico de HER-2/*neu* como a Fc gamma RIII (CD16), el receptor Fc gamma expresado por linfocitos citolíticos naturales humanos, neutrófilos y fagocitos mononucleares diferenciados (Weiner *et al.*, J. Hematotherapy, 4: 471 [1995]).

35 La sobreexpresión de HER-2 también se ha encontrado asociada con la resistencia aumentada a la quimioterapia. Por lo tanto, los pacientes con niveles elevados de HER-2 responden mal a muchos fármacos. Los métodos usados para inhibir la expresión de HER-2 se han combinado con agentes quimioterapéuticos de uso común (Ueno *et al.*, Oncogene 15: 953 [1997]). La combinación de producto génico de adenovirus de tipo 5, E1A, con taxol demostró un efecto sinérgico en células de cáncer de mama humanas. Zhang *et al.*, (Oncogene, 12: 571 [1996]) demostraron que
40 la emodina, un inhibidor específico de tirosina, sensibilizó a células de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) a diversos fármacos quimioterapéuticos, incluyendo cisplatino, doxorubicina y etopósido. Se descubrió que un anticuerpo de HER-2 aumenta la eficacia del tamoxifeno en las células de cáncer de mama humano (Witters *et al.*, Breast Cancer Res. and Treatment, 42: 1 [1997]).

45 También se han usado oligonucleótidos para estudiar la función de HER-2. Se descubrió que un oligonucleótido formador de tríplex, dirigido al promotor de HER-2, de 42 a 69 nucleótidos cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción del ARNm, inhibe la expresión de HER-2 *in vitro* (Ebbinghaus *et al.*, J. Clin. Invest., 92: 2433 [1993]). Porumb *et al.* (Cancer Res., 56: 515 [1996]) también usaron un oligonucleótido formador de tríplex dirigido a la misma región promotora de HER-2. Se observaron disminuciones en el ARNm de HER-2 y los niveles de proteínas en células cultivadas. Juhl *et al.* (J. Biol. Chem., 272: 29482 [1997]) usaron ribozimas anti-HER-2 dirigidas a una
50 región central del ARN de HER-2 justo cadena debajo de la región transmembrana de la proteína para demostrar una reducción en el ARNm de HER-2 y los niveles de proteínas en células de cáncer de ovario humanas. También se observó una reducción en el crecimiento tumoral en ratones desnudos.

55 También se ha usado una estrategia antisentido como un agente terapéutico potencial para cánceres que sobreexpresan HER-2. Pegues *et al.* (Cancer Lett., 117: 73 [1997]) clonaron un fragmento de 1,5 kb de HER-2 en una orientación antisentido en un vector de expresión; la transfección de esta construcción en células de cáncer de ovario dio como resultado una reducción del crecimiento independiente de anclaje. Casalini *et al.* (Int. J. Cancer 72: 631 [1997]) usaron varias construcciones de vector antisentido de HER-2, que contenían fragmentos de HER-2
60 desde 151 pb hasta 415 pb de longitud, para demostrar la reducción en los niveles de proteína de HER-2 y el crecimiento independiente de anclaje en células de adenocarcinoma de pulmón. Colomer *et al.* (Br. J. Cancer, 70: 819 [1994]) demostraron que los oligonucleótidos antisentido fosfodiéster dirigidos a o inmediatamente cadena abajo del codón de inicio de la traducción inhibieron la proliferación de células de cáncer de mama humanas en hasta un 60 %. Wiechen *et al.* (Int. J. Cancer 63: 604 [1995]) demostraron que un oligonucleótido de fosforotioato de 18
65 nucleótidos dirigido a la región codificante, 33 nucleótidos cadena abajo del codón de inicio de la transcripción, de HER-2 redujo el crecimiento independiente de anclaje de células de cáncer de ovario. Bertram *et al.* (Biochem.

Biophys. Res. Commun., 200: 661 [1994]) usaron oligonucleótidos de fosforotioato antisentido dirigidos a la región de inicio de la traducción y una secuencia en la parte 3' de la región traducida del ARNm que tiene una homología elevada con una secuencia consenso de tirosina quinasa, y demostraron una reducción del 75 % en los niveles de proteína de HER-2 en células de cáncer de mama humanas. Liu *et al.* (Antisense and Nucleic Acid Drug Develop., 6: 9 [1996]) usaron oligonucleótidos de fosforotioato antisentido dirigidos al sitio de protección 5' y a la región codificante. El oligonucleótido más efectivo, dirigido al sitio de protección 5', redujo la expresión de la proteína HER-2 en un 90 %. También se redujo la proliferación celular en una cantidad comparable. Vaughn *et al.* (Nuc. Acids. Res., 24: 4558 [1996]) usaron oligonucleótidos antisentido de fosforotioato, fosforditioato y quiméricos dirigidos a o adyacentes a (cualquier lado) de la región de inicio de la traducción de HER-2. Un oligonucleótido de ditioato/diéster alternativo dirigido a la región de inicio de la traducción funcionó ligeramente mejor que un oligonucleótido completamente de fosforotioato. Brysch *et al.* (Cancer Gene Ther., 1: 99 [1994]) usaron oligonucleótidos antisentido químicamente modificados dirigidos al codón de inicio de la traducción de HER-2 para reducir los niveles de proteína y provocar una detención del crecimiento de una línea celular de cáncer de mama humano.

15 c. C-Myc

El producto génico *c-myc* está codificado por un gen de respuesta temprana inmediata, cuya expresión puede inducirse mediante varios mitógenos. La expresión de *c-myc* está implicada en las rutas de transducción de señales que dan lugar a la división celular. Los estudios han demostrado que las células en proliferación tienen niveles mayores de ARNm de *c-myc* y de proteína de *c-myc* que las células quiescentes. Se sabe que los anticuerpos dirigidos contra la proteína *c-myc* inhiben la síntesis de ADN en los núcleos aislados de células humanas. Por el contrario, la expresión constitutiva de *c-myc* producida mediante transferencia génica inhibe la diferenciación inducida de varias líneas celulares. La expresión constitutiva de *c-myc* predispone a los ratones transgénicos al desarrollo de tumores.

Algunos estudios han sugerido que el producto génico de *c-myc* puede jugar un papel proliferativo en SMC (células de músculo liso). Se sabe que la des-endotelización por globo y la lesión de aortas de rata aumentan la expresión de ARNm de *c-myc* de SMC vasculares antes de su proliferación y migración posterior. También, las SMC en cultivo proliferan cuando se exponen a varios mitógenos, incluyendo PDGF, FGF, EGF, IGF-1 y a suero. Se ha descubierto que cada uno de estos mitógenos es capaz de aumentar la expresión en otras líneas celulares de proteínas *c-myc*, ARNm de *c-myc* o ambos. Además, se ha descubierto que el suero de la sangre aumenta los niveles de ARNm de *c-myc* en SMC.

Harel-Bellan *et al.* (J. Immun. 140; 2431-2435 (1988)) demostraron que los oligonucleótidos antisentido complementarios al ARNm de *c-myc* inhibían de manera eficaz la traducción del mismo en células T humanas. Se evitaba que estas células T entrasen en la fase S de división celular. Las secuencias de los proto-oncogenes de *c-myc* se describen en Marcu *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 61: 809-860 [1992]; Watt *et al.*, Nature, 303: 725-728 [1983]; Battey *et al.*, Cell, 34: 779-787 (1983); y Epstein *et al.*, publicación NTIS PB93-100576.

40 d. Bcl2

En muchos tipos de tumores humanos, incluyendo linfomas y leucemias, el gen de *bcl-2* está sobreexpresado, y puede estar asociado con la tumorigenicidad (Tsujimoto *et al.*, Science 228:1440-1443 [1985]). Se han encontrado niveles elevados de expresión del gen *bcl-2* humano en todos los linfomas con translocaciones cromosómicas t(14; 18), incluyendo la mayoría de los linfomas de células B foliculares y muchos linfomas no Hodgkin de células grandes. También se han encontrado elevados niveles de expresión del gen *bcl-2* en determinadas leucemias que no tienen una translocación cromosómica t(14; 18), incluyendo en la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica, aguda, muchas leucemias linfocíticas del tipo de célula pre-B, neuroblastomas, carcinomas nasofaríngeos, y muchos adenocarcinomas de la próstata, mama y colon. (Reed *et al.*, Cancer Res. 51:6529 [1991]; Yunis *et al.*, New England J. Med. 320:1047; Campos *et al.*, Blood 81:3091-3096 [1993]; McDonnell *et al.*, Cancer Res. 52:6940-6944 [1992]); Lu *et al.*, Int. J Cancer 53:29-35 [1993]; Bonner *et al.*, Lab Invest. 68:43A [1993]).

e. TGF- α

El factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) es un polipéptido de 50 aminoácidos. Se aisló por primera vez a partir de una línea celular de ratón transformada con retrovirus y posteriormente se identificó en células tumorales humanas, en células embrionarias de ratas en las primeras fases de desarrollo del embrión y en cultivos celulares de glándula pituitaria humana. TGF- α está estrechamente relacionado con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), tanto estructural como funcionalmente, y ambos se unen al mismo receptor, es decir, al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

Se han determinado secuencia y la estructura tridimensional tanto de EGF como de TGF- α (Campbell *et al.*, Prog. Growth Factor Res. 1:13 [1989]). TGF- α es un polipéptido de 50 aminoácidos que tiene aproximadamente un 40 % de homología de restos con EGF. Ambos péptidos se caracterizan por tres bucles bien definidos (denominados A, B y C) y tienen tres puentes disulfuro intramoleculares.

Se cree que varios factores de crecimiento, incluyendo TGF- α y EGF, ejercen sus efectos biológicos mediante la interacción con el receptor de factor de crecimiento epidérmico (receptor de EGF). El receptor de EGF es una tirosina quinasa receptora de Tipo 1. El receptor de EGF y sus ligandos son de interés debido a sus funciones en procesos fisiológicos normales así como en enfermedades hiperproliferativas y neoplásicas.

El precursor *in vivo* de TGF- α es una proteína unida a membrana de 160 restos de aminoácidos (pro-TGF- α) que se escinde para producir un compuesto soluble (Massague, J. Biol. Chem.; 265:21393-21396 [1990]). Esta escisión elimina una porción extracelular compuesta de 50 aminoácidos con un peso molecular de 6 kd y se considera un suceso regulador importante (Pandiella *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:1726-1730 [1990]) que puede estimularse mediante ésteres de forbol que actúan mediante la proteína quinasa C (Pandiella *et al.*, J. Biol. Chem., 266:5769-5773 [1991]).

Las líneas de tumor prostático humano cultivadas contienen niveles elevados de ARNm de TGF- α y proliferan en respuesta a TGF- α (Wilding *et al.*, The Prostate, 15:1-12 [1989]). TGF- α parece tener función tanto paracrina como autocrina, estimulando actividades fisiológicas tales como la división celular y la angiogénesis. Cuando se indujo en ratones transgénicos, TGF- α produjo hiperplasia epitelial y cambios displásicos focales que se asemejaron al carcinoma *in situ* (Sandgren *et al.*, Cell, 61:1121-1135 [1990]).

f. c-ki-Ras

El oncogén *c-Ki-ras* (KRAS) se expresa de manera ubicua. KRAS, con una longitud de más de 30 kb, es mucho más largo que HRAS o NRAS. Aunque los 3 genes, HRAS, KRAS y NRAS, tienen diferentes estructuras genéticas, todos codifican proteínas de 189 restos de aminoácidos, denominadas genéricamente p21. Estos genes adquieren propiedades malignas mediante mutaciones puntuales individuales que afectan a la incorporación del 12^o o 61^o aminoácido de su p21 respectiva. KRAS está implicado en las neoplasias mucho más a menudo que HRAS. En un estudio de 96 tumores o líneas celulares tumorales humanas en el sistema transformante NIH 3T3, (Pulciani *et al.*, Nature 300: 539 (1982)) encontraron un locus de HRAS mutado solo en células de cáncer de vejiga T24, mientras que se identificaron genes de KRAS transformantes en 8 carcinomas y sarcomas diferentes.

En un cistadenocarcinoma seroso de ovario, Feig *et al.* (Science 223: 698 (1984)) demostraron la presencia de un oncogén de KRAS activado no activado en células normales del mismo paciente. El producto génico transformante mostró una movilidad electroforética en geles de SDS-poliacrilamida que difería de la movilidad de proteínas transformantes de KRAS en otros tumores. Por lo tanto, una mutación anteriormente no descrita era responsable de la activación de KRAS en este carcinoma ovárico. Para estudiar el papel de los oncogenes en el cáncer de pulmón, Rodenhuis *et al.* (New Eng. J. Med. 317: 929 (1987)) usaron un ensayo basado en la hibridación de oligonucleótidos después de una etapa de amplificación *in vitro*. Se examinó el ADN genómico de 39 especímenes de tumor obtenidos mediante toracotomía. Se descubrió que el gen de KRAS estaba activado mediante mutaciones puntuales en el codón 12 en 5 de 10 adenocarcinomas. Dos de esos tumores tenían menos de 2 cm de tamaño y no habían metastatizado. No se observaron mutaciones de HRAS, KRAS o NRAS en 15 carcinomas de células escamosas, 10 carcinomas de células grandes, 1 carcinoide, 2 adenocarcinomas metastásicos de tumores primarios fuera del pulmón y un carcinoma microcítico. Se observó una amplificación de aproximadamente 20 veces del gen de KRAS no mutado en un tumor que se demostró que era una metástasis pulmonar solitaria de un carcinoma rectal. Yanez *et al.* (Oncogene 1:315 (1987)) encontraron mutaciones en el codón 12 del gen de KRAS en 4 de 16 cánceres de colon, 2 de 27 cánceres de pulmón y 1 de 8 cánceres de mama; no se encontraron mutaciones en la posición 61. De los 6 posibles reemplazos de aminoácidos en el codón 12, todos salvo uno estaban representados en las 7 mutaciones identificadas.

g. Otras dianas oncogénicas

La presente invención no está limitada a los oncogenes descritos anteriormente. Los métodos de la presente invención son adecuados para su uso con cualquier oncogén con una región promotora conocida. Los oncogenes ejemplares incluyen, pero sin limitación, BCR/ABL, ABL1/BCR, ABL, BCL1, CD24, CDK4, EGFR/ERBB-1, HSTF1, INT1/WNT1, INT2, MDM2, MET, MYB, MYC, MYCN, MYCL1, RAF1, NRAS, REL, AKT2, APC, BCL2-ALPHA, BCL2-BETA, BCL3, BCR, BRCA1, BRCA2, CBL, CCND1, CDKN1A, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CRK, CRK-II, CSF1R/FMS, DBL, DDOST, DCC, DPC4/SMAD4, E-CAD, E2F1/RBAP, ELK1, ELK3, EPH, EPHA1, E2F1, EPHA3, ERG, ETS1, ETS2, FER, FGR, FLI1/ERGB2, FOS, FPS/FES, FRA1, FRA2, FYN, HCK, HEK, HER3/ERBB-2, ERBB-3, HER4/ERBB-4, HST2, INK4A, INK4B, JUN, JUNB, JUND, KIP2, KIT, KRAS2A, KRAS2B, LCK, LYN, MAS, MAX, MCC, MLH1, MOS, MSH2, MYBA, MYBB, NF1, NF2, P53, PDGFB, PIM1, ETC, RB1, RET, ROS1, SKI, SRC1, TAL1, TGFB2, THRA1, THRB, TIAM1, TRK, VAV, VHL, WAF1, WNT2, WT1, YES1, ALK/NPM1, AMI1, AXL, FMS, GIP, GLI, GSP, HOX11, HST, IL3, INT2, KS3, K-SAM, LBC, LMO-1, LMO-2, L-MYC, LYL1, LYT-10, MDM-2, MLH1, MLL, MLM, N-MYC, OST, PAX-5, PMS-1, PMS-2, PRAD-1, RAF, RHOM-1, RHOM-2, SIS, TAL2, TAN1, TIAM1, TSC2, TRK, TSC1, STK11, PTCH, MEN1, MEN2, P57/KIP2, PTEN, HPC1, ATM, XPA/XPG, BCL6, DEK, AKAP13, CDH1, BLM, EWSR1/FLI1, FES, FGF3, FGF4, FGF6, FANCA, FLI1/ERGB2, FOSL1, FOSL2, GLI, HRAS1, HRX/MLLT1, HRX/MLLT2, KRAS2, MADH4, MAS1, MCF2, MLLT1/MLL, MLLT2/HRX, MTG8/RUNX1, MYCLK1, MYH11/CBFB, NFKB2, NOTCH1, NPM1/ALK, NRG/REL, NTRK1, PBX1/TCF3, PML/RARA, PRCA1, RUNX1,

RUNX1/CBFA2T1, SET, TCF3/PBX1, TGFB1, TLX1, P53, WNT1, WNT2, WT1, α - β 3, PKC α , TNF α , clusterina, survivina, TGF β , c-fos, c-SRC, e INT-1.

2. Dianas no oncogénicas

La presente invención no se limita al uso de oncogenes como dianas. Los métodos y composiciones de la presente invención son útiles para dirigirse a cualquier gen que sea deseable para regular negativamente su expresión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los genes para usarse como diana incluyen, pero sin limitación, un gen de inmunoglobulina o anticuerpo, un gen de factor de coagulación, una proteasa, una hormona pituitaria, un inhibidor de proteasas, un factor de crecimiento, una somatomedina, una gonadotropina, una quimiotactina, una quimiocina, una proteína plasmática, un inhibidor de proteasa plasmática, una interleucina, un interferón, una citocina, un factor de transcripción o una diana patógena (por ejemplo, un gen viral, un gen bacteriano, un gen microbiano o un gen fúngico).

Los ejemplos de genes específicos incluyen, pero sin limitación, ADAMTS4, ADAMTS5, APOA1, APOE, APP, B2M, COX2, CRP, DDX25, DMC1, FKBP8, GH1, GHR, IAPP, IFNA1, IFNG, IL1, I110, IL12, IL13, IL2, IL4, IL7; IL8, IPW, MAPK14, Mei1, MMP13, MYD88, NDN, PACE4, PRNP, PSEN1, PSEN2, RAD51, RAD51C, SAP, SNRPN, TLR4, TLR9, TTR, UBE3A, VLA-4, and PTP-1B, c-RAF, m-TOR, LDL, VLDL, ApoB-100, HDL, VEGF, rhPDGF-BB, NADs, ICAM-1, MUC1, 2-dG, CTL, PSGL-1, E2F, NF- κ B, HIF, y GCPR.

En otras realizaciones se usa como diana un gen de un patógeno. Los patógenos ejemplares incluyen, pero sin limitación, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus de la hepatitis A, el virus sincitial respiratorio, patógenos implicados en el síndrome respiratorio agudo severo, el virus del Nilo occidental y patógenos alimentarios (por ejemplo, *E. coli*).

3. Oligonucleótidos

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona oligonucleótidos antígenos para inhibir la expresión de oncogenes. A continuación se describen estrategias de diseño y producción ejemplares para antígenos. La descripción proporcionada a continuación no pretende limitar el alcance de los compuestos antígenos adecuados para su uso en la presente invención y otros antígenos se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

a. Regiones reguladoras de los oncogenes

El gen *bcl-2* tiene dos promotores denominados P1 y P2. P1, a partir del cual se transcribe la mayoría del ARNm de *bcl-2*, se localiza aproximadamente 1,4 kb cadena arriba del sitio de inicio de la traducción y P2 se encuentra 1,3 kb cadena debajo de P1. (Véase Seto, M. *et al.* EMBO J. 7, 123-131 (1988)). P1 es rico en GC, carece de caja de TATA, tiene muchos sitios de inicio de la transcripción e incluye siete sitios de unión consenso para el factor de transcripción SP1. P2 incluye una caja de CCAAT y una caja de TATA y tiene dos sitios de inicio de la transcripción diferentes. Hay múltiples sitios de reconocimiento de NF- κ B y un motivo octamérico similar al potenciador de SV40 en P2. (Véase Heckman, C.A., *et al.* Oncogene 21, 3898-3908 (2002)). (Véase la SEC ID N° 1254). La mayoría de los linfomas foliculares humanos contienen translocaciones cromosómicas t(14;18) que son el resultado de puntos de rotura de la región del gen 3'-*bcl-2*. (Véase Tsujimoto, Y. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 84, 1329-1331 (1987)). Estas translocaciones sitúan a la expresión de *bcl-2* bajo el control del potenciador del locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) dando como resultado la regulación positiva de la expresión de BCL2. Como alternativa, hay regiones de punto de rotura de 5'-*bcl-2* que son el resultado de fusiones con el locus de IgH o dos loci de cadena ligera de inmunoglobulina (IgL) que se encuentran en algunos aislados de pacientes de linfoma de DLCL. (Véase Yonetani, N. *et al.* Jpn. J. Cancer Res. 92, 933-940 (2001)). Estos puntos de rotura de 5'-*bcl-2* se han mapeado en aislados de paciente heterogéneo separados a una región que abarca de 378 a 2312 pb del sitio de inicio de la traducción. (Véanse las SEC ID N° 1255-1266). Las regiones alrededor de los puntos de rotura pueden ser secuencias que pueden usarse para el diseño del oligonucleótido de *bcl-2*.

Las regiones cadena arriba de TGF- α , *c-ki-ras*, *c-myc*, *c-erb-2* (Her-2), y *c-Ha-ras* también pueden investigarse para encontrar regiones a las que los nucleótidos puedan unirse basándose en los criterios de diseño preferidos.

b. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos pueden incluir cualquier oligómero que hibride con las regiones cadena arriba de los genes *c-ki-ras*, *c-Ha-ras*, *c-myc*, *her-2*, TGF- α , o *bcl-2*. Para los fines de la presente invención, las regiones cadena arriba se identifican como SEC ID N° 1 (para *her-2*, o *c-erb-2*), SEC ID N° 282 (para *c-ki-ras*), SEC ID N° 462 (para *c-Ha-ras*), SEC ID N° 936 (para *c-myc*), SEC ID N° 1.081 (para TGF- α) y SEC ID N° 1249 y 1254 (para *bcl-2*).

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se diseñan basándose en criterios de diseño preferidos. Dichos oligonucleótidos pueden ensayarse entonces respecto a su eficacia usando los métodos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos están metilados en al menos uno, dos o en las tres islas de CpG. En otras realizaciones, los oligonucleótidos no contienen metilación. La presente invención no

está limitada a un mecanismo particular. De hecho, no es necesario un entendimiento del mecanismo para poner en práctica la presente invención. Sin embargo, se contempla que los oligonucleótidos en algunas realizaciones sean aquellos que tienen un contenido de GC de al menos un 50 % y al menos dos dinucleótidos de GC. También, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos no hibridan consigo mismos. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos se diseñan con al menos una A o T para minimizar la autohibridación. En otras realizaciones más, se usan programas informáticos comercialmente disponibles para explorar oligonucleótidos respecto de su capacidad para autohibridar. En otras realizaciones más, los oligonucleótidos son de al menos 10 o 15 nucleótidos y no más de 100 nucleótidos de longitud. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos son de 18-26 nucleótidos de longitud. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos comprenden las secuencias de unión a proteínas universales CGCC y CGCG o los complementos de las mismas.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos hibridan con una región promotora de un gen cadena arriba de la caja de TATA del promotor. En realizaciones adicionales, se diseñan los oligonucleótidos para que hibriden con regiones de la región promotora de un oncogén que se sabe que está unido a proteínas (por ejemplo, factores de transcripción). En algunas realizaciones, los compuestos oligonucleotídicos no son completamente homólogos a otras regiones del genoma humano. La homología de los compuestos oligonucleotídicos de la presente invención con otras regiones del genoma puede determinarse usando herramientas de búsqueda disponibles (por ejemplo, BLAST, disponible en el sitio de internet de NCBI).

La presente invención no está limitada a los oligonucleótidos descritos en el presente documento. Pueden identificarse otros oligonucleótidos adecuados (por ejemplo, usando los criterios descritos anteriormente u otros criterios). Los oligonucleótidos candidatos pueden ensayarse respecto a su eficacia usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los oligonucleótidos candidatos pueden evaluarse respecto de su capacidad para prevenir la proliferación celular a diversas concentraciones. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos inhiben la expresión génica o la proliferación celular a bajas concentraciones (por ejemplo, menos de 20 µM, o 10 µM en ensayos *in vitro*).

c. Zonas oligonucleotídicas

En algunas realizaciones, las regiones en la región promotora de un oncogén se definen adicionalmente como regiones para la hibridación de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, estas regiones se citan como "zonas calientes".

En algunas realizaciones, las zonas calientes se definen basándose en compuestos oligonucleotídicos que se han demostrado que son efectivos (véase la sección anterior acerca de los oligonucleótidos) y aquellos que se contemplan como eficaces basándose en los criterios para los oligonucleótidos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, las zonas calientes abarcan 10 pb cadena arriba y cadena abajo de cada compuesto incluido en cada zona caliente y tienen al menos un CG o más en un incremento de 40 pb adicionalmente cadena arriba o cadena abajo de cada compuesto. En realizaciones adicionales, las zonas calientes abarcan un máximo de 100 pb cadena arriba y cadena abajo de cada compuesto oligonucleotídico incluido en la zona caliente. En realizaciones adicionales, las zonas calientes se definen en las regiones de inicio de cada promotor. Estas zonas calientes se definen bien basándose en secuencias eficaces o secuencias contempladas y tienen una longitud máxima preferida de 200 pb. Basándose en los criterios anteriormente descritos, se diseñaron zonas calientes ejemplares. Estas zonas calientes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Zonas calientes ejemplares	
Gen	Zonas calientes
Bcl-2	679-720, 930-1050. 1070-1280. 11420-1760
c-erbB-2	206-346, 384-437
c-K-ras	1-290, 433-659
c-Ha-ras	21-220, 233-866, 1417-1536, 1637-1728
c-myc	71-263, 299-770
TGF-α	1-90, 175-219, 264-370, 434-934, 968-1183

d. Descripción

Para el gen *bcl-2*, el oligómero puede ser cualquier oligómero que hibride con la SEC ID N° 1249 o 1254. En otro aspecto, el oligómero puede ser cualquier oligómero que hibride con los nucleótidos 500-2026, los nucleótidos 500-1525, los nucleótidos 800-1225, los nucleótidos 900-1125, los nucleótidos 950-1075 o los nucleótidos 970-1045 de la

SEC ID N° 1249 o el complemento de la misma.

En otra realización, el oligómero puede ser la SEC ID N° 1250, 1251, 1252, 1253, o el complemento de las mismas. En otra realización más, el oligómero puede ser las SEC ID N° 1250 o 1251.

En una realización adicional de estos aspectos, el oligómero tiene la secuencia de la hebra positiva de la secuencia de *bcl-2*, y por lo tanto, se une a la hebra negativa de la secuencia.

En otros aspectos, los oligómeros pueden incluir mezclas de oligonucleótidos de *bcl-2*. Los oligómeros pueden hibridar con regiones solapantes en estas secuencias o los oligómeros pueden hibridar con regiones no solapantes. En otras realizaciones, los oligómeros pueden ser las SEC ID N° 1250, 1251, 1252, 1253, o el complemento de las mismas donde la mezcla de oligómeros de *bcl-2* comprende oligómeros de al menos 2 secuencias diferentes.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona agentes terapéuticos oligonucleotídicos que están metilados en sitios específicos. La presente invención no está limitada a un mecanismo particular. De hecho, no es necesario un entendimiento del mecanismo para poner en práctica la presente invención. Sin embargo, se contempla que un mecanismo para la regulación de la actividad génica sea la metilación de restos de citosina en el ADN. La 5-metilcitosina (5-MeC) es la única base modificada de origen natural detectada en el ADN (Ehrlick *et al.*, *Science* 212:1350-1357 (1981)). Aunque no todos los genes están regulados mediante metilación, la hipometilación en sitios específicos o en regiones específicas en varios genes está correlacionada con la transcripción activa (Doerfler, *Annu. Rev. Biochem.* 52:93-124 [1984]; Christman, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 108:49-78 [1988]; Cedar, *Cell* 34:5503-5513 [1988]). La metilación del ADN *in vitro* puede evitar la transcripción eficaz de genes en un sistema sin células o la expresión transitoria de genes transfectados. La metilación de restos de C en algunas regiones reguladoras en cis también puede bloquear o potenciar la unión de factores o represores transcripcionales (Doerfler, anteriormente citado; Christman, anteriormente citado; Cedar, *Cell* 34:5503-5513 (1988); Tate *et al.*, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:225-231 [1993]; Christman *et al.*, *Virus Strategies*, eds. Doerfler, W. & Bohm, P. (VCH, Weinheim, N.Y.) pág. 319-333 [1993]).

La alteración de los patrones normales de metilación del ADN se ha relacionado con el desarrollo del cáncer (Christman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7347-7351 [1995]). El contenido de 5-MeC del ADN de tumores y líneas celulares derivadas de tumores es generalmente menor que en tejidos normales (Jones *et al.*, *Adv. Cancer Res* 40:1-30 [1983]). Se ha detectado la hipometilación de oncogenes específicos tales como c-myc, c-Ki-ras y c-Ha-ras en diversos tumores animales y humanos (Nambu *et al.*, *Jpn. J. Cancer (Gann)* 78:696-704 [1987]; Feinberg *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111:47-54 [1983]; Cheah *et al.*, *JNCI* 73:1057-1063 [1984]; Bhave *et al.*, *Carcinogenesis (Lond)* 9:343-348 [1988]). En uno de los ejemplos mejor estudiados de progresión tumoral humana, se ha demostrado que la hipometilación del ADN es un evento temprano en el desarrollo del cáncer de colon (Goetz *et al.*, *Science* 228:187-290 [1985]). La interferencia con la metilación *in vivo* puede dar lugar a la formación de tumores. Se ha notificado que el suministro de inhibidores de la metilación tales como L-metionina o 5-azacitidina o una deficiencia grave de 5-adenosina metionina mediante la alimentación con una dieta empobrecida en agentes lipotrópicos induce la formación de tumores hepáticos en ratas (Wainfan *et al.*, *Cancer Res.* 52:2071s-2077s [1992]). Los estudios demuestran que las dietas extremadamente deficientes en agentes lipotrópicos pueden provocar una pérdida de grupos metilo en sitios específicos en genes tales como c-myc, ras y c-fos (Dizik *et al.*, *Carcinogenesis* 12:1307-1312 [1991]). La hipometilación sucede a pesar de la presencia de niveles elevados de actividad de ADN MTasa (Wainfan *et al.*, *Cancer Res.* 49:4094-4097 [1989]). Los genes necesarios para la proliferación activa sostenida se hacen inactivos en forma metilada durante la diferenciación y los genes específicos de tejido se hipometilan y son activos. Por lo tanto, la hipometilación puede cambiar el equilibrio entre los dos estados. En algunas realizaciones, la presente invención por lo tanto se beneficia de este fenómeno de origen natural, para proporcionar composiciones y métodos para la metilación de sitio específico de promotores de genes específicos, evitando de este modo la transcripción y por lo tanto la traducción de determinados genes. En otras realizaciones, la presente invención proporciona métodos y composiciones para regular positivamente la expresión de un gen de interés (por ejemplo, un gen supresor de tumores) mediante la alteración de los patrones de metilación del gen.

La presente invención no está limitada al uso oligonucleótidos metilados. De hecho, el uso de oligonucleótidos no metilados para la inhibición de la expresión génica está contemplado específicamente por la presente invención. Los experimentos llevados a cabo durante el transcurso del desarrollo de la presente invención (véase por ejemplo, el Ejemplo 8) demostraron que un oligonucleótido no metilado dirigido hacia Bcl-2 inhibía el crecimiento de células de linfoma a un nivel que era comparable al de un oligonucleótido metilado.

4. Preparación y formulación de oligonucleótidos

Puede usarse cualquiera de los métodos conocidos de síntesis de oligonucleótidos para preparar los oligonucleótidos modificados de la presente invención. En algunas realizaciones que utilizan oligonucleótidos metilados, el nucleótido dC se reemplaza por 5-metil-dC donde se ha adecuado, tal como se enseña por la presente invención. Los oligonucleótidos modificados o no modificados de la presente invención se preparan más convenientemente mediante el uso de cualquiera de los sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados disponibles comercialmente. También pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales que sintetizan

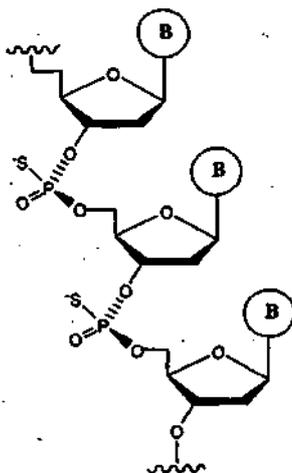
oligonucleótidos a medida siguiendo las especificaciones del cliente.

5 Aunque los oligonucleótidos son una forma de compuesto, la presente invención comprende otros compuestos oligonucleotídicos u oligoméricos, incluyendo, pero sin limitación miméticos de oligonucleótidos tales como los descritos a continuación. Los compuestos oligonucleotídicos de acuerdo con esta invención comprenden normalmente de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 nucleobases (es decir, de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 bases enlazadas), aunque pueden ser útiles secuencias tanto más largas como más cortas para su uso con la presente invención.

10 Los ejemplos específicos de compuestos útiles con la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen estructuras modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Tal como se define en la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen estructuras modificadas incluyen los que contienen un átomo de fósforo en la estructura y los que no tienen un átomo de fósforo en la estructura. Para los fines de la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su estructura internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos.

15 Las estructuras oligonucleotídicas modificadas incluyen, por ejemplo, fosfortioatos, fosfortioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil fosfonatos y otros alquil fosfonatos incluyendo 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, y boranofosfonatos que tienen análogos normales con enlaces 3'-5', enlazados en 2'-5' de estos y los que tienen polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados de 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

25 En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene una estructura de fosfortioato que tiene la siguiente estructura general.



30 Las estructuras oligonucleotídicas modificadas que no incluyen un átomo de fósforo tienen estructuras que se forman mediante enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo mixto y de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción del azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras de formaceto y tioformaceto; estructuras de metileno formaceto y tioformaceto; estructuras que contienen alqueno; estructuras de sulfamato; estructuras de metilenoimino y metilenoimidazino; estructuras de sulfonato y sulfonamida; estructuras de amida; y otras que tengan partes de componente N, O, S y CH₂.

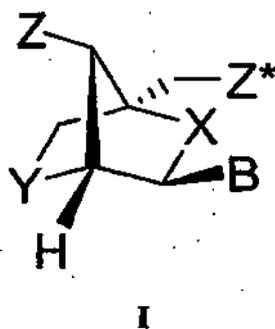
35 En otros miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico (es decir, la estructura) de las unidades de nucleótidos se reemplazan con grupo nuevos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico adecuado. Uno de dichos compuestos oligoméricos, un mimético de oligonucleótidos que se ha demostrado que tiene excelente propiedades de hibridación, se cita como un ácido péptido nucleico (APN). En los compuestos de APN, la estructura de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con una estructura que contiene amida, en particular una estructura de aminoetilglicina. Las nucleobases se mantienen y unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción de amida de la estructura: las patentes representativas que enseñan la preparación de compuestos de APN incluyen, pero sin limitación, las patentes de EE.UU. N^o: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales acerca de compuestos de APN en Nielsen *et al.*, Science 254:1497 (1991) y Neilsen, Methods in Enzymology, 313, 156-164 (1999). Los compuestos de

APN pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, a través de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU).

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras de heteroátomo, y en particular $-\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [conocido como estructura de metileno (metilénimino) o MMI], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, y $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [donde la estructura de fosfodiéster nativa está representada como $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] de la patente de EE.UU N° 5.489.677, anteriormente citada, y las estructuras de amida de la patente de EE.UU N° 5.602.240 anteriormente citada. También son ejemplares los oligonucleótidos que tienen estructuras de armazón de morfolino de la patente de EE.UU N° 5.034.506 anteriormente citada.

Los oligonucleótidos también pueden tener azúcares distintos de ribosa y desoxirribosa, incluyendo arabinofuranosa (descrita en la publicación internacional número WO 99/67378, que se incorpora en el presente documento por referencia), xiloarabinofuranosa (descrita en las patentes de EE.UU N° 6.316.612 y 6.489.465, que se incorporan en el presente documento por referencia), α -treofuranosa (Schöning, *et al.* (2000) Science, 290, 1347-51, que se incorpora en el presente documento por referencia) y L-ribofuranosa. Los miméticos de azúcares pueden reemplazar al azúcar en los nucleótidos. Estos incluyen ciclohexeno (Wang *et al.* (2000) J. Am. Chem. Soc. 122, 8595-8602; Vebeure *et al.* Nucl. Acids Res. (2001) 29, 4941-4947, que se incorpora en el presente documento por referencia), un grupo triciclo (Steffens, *et al.* J. Am. Chem. Soc. (1997) 119, 11548-11549, que se incorpora en el presente documento por referencia), un grupo ciclobutilo, un grupo hexitol (Maurinsh, *et al.* (1997) J. Org. Chem, 62,2861-71; J. Am. Chem. Soc. (1998) 120, 5381-94, que se incorpora en el presente documento por referencia), un grupo altritol (Allart, *et al.*, Tetrahedron (1999) 6527-46, que se incorpora en el presente documento por referencia), un grupo pirrolidina (Scharer, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 117, 6623-24, que se incorpora en el presente documento por referencia), grupos carbocíclicos obtenidos reemplazando el oxígeno del anillo de furanosa con un grupo metileno (Froehler y Ricca, J. Am. Chem. Soc. 114, 8230-32, que se incorpora en el presente documento por referencia) o con un S para obtener 4'-tiofuranosa (Hancock, *et al.*, Nucl. Acids Res. 21, 3485-91, que se incorpora en el presente documento por referencia), y/o grupo morfolino (Heasman, (2002) Dev. Biol., 243,209-214, que se incorpora en el presente documento por referencia) en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Los oligonucleótidos de morfolino están comercialmente disponibles a través de Gene Tools, LLC (Corvallis Oregon, EE.UU).

Los oligonucleótidos también pueden incluir "ácidos nucleicos bloqueados" o ALN. Los ALN pueden bicíclicos, tricíclicos o policíclicos. Los ALN incluyen una serie de diferentes monómeros, uno de los cuales se ilustra en la Fórmula I.



en la que

B constituye una nucleobase;

Z* se selecciona entre un enlace internucleosídico y un grupo terminal;

Z se selecciona entre un enlace al enlace internucleosídico de un nucleótido/nucleósido precedente y un grupo terminal, siempre que solo uno de Z y Z* pueda ser un grupo terminal;

X e Y se seleccionan independientemente entre $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{H})-$, $-\text{N}(\text{R})-$, $-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(\text{H})=$, $\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})=$, $-\text{CH}=\text{CH}-$;

siempre que X e Y no sean ambos O.

Además de los monómeros de ALN [2'-Y,4'-C-metilen- β -D-ribofuranosilo] ilustrados en la Fórmula I (a [2,2,1] biciclo nucleósido), un nucleótido de ALN también puede incluir "ácidos nucleicos bloqueados" con otra furanosa u otros anillos de 5 o 6 miembros y/o con una formulación monomérica diferente, incluyendo bicloneucleósidos enlazados a 2'-Y,3' y enlazados a 3'-Y,4', enlazados a 1'-Y,3, enlazados a 1'-Y,4', enlazados a 3'-Y,5', enlazados a 2'-Y, 5', enlazados a 1'-Y,2' y otros. Todos los ALN anteriormente mencionados pueden obtenerse con diferentes centros quirales, dando como resultado, por ejemplo, monómeros de ALN de [3'-Y-4'-C-metilen (o etilen)- β (o α)-arabino-, xilo- o L-ribo-furanosilo]. Los oligonucleótidos de ALN y los nucleótidos de ALN se describen generalmente en la

publicación internacional N° WO 99/14226 y en solicitudes posteriores; las publicaciones internacionales N° WO 00/56746, WO 00/56748, WO 00/66604, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 02/094250, WO 03/006475; las patentes de EE.UU N° 6.043.060, 6.268.490, 6.770.748, 6.639.051, y las publicaciones de EE.UU N° 2002/0125241, 2003/0105309, 2003/0125241, 2002/0147332, 2004/0244840 y 2005/0203042, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Los oligonucleótidos de ALN y los oligonucleótidos análogos de ALN están comercialmente disponibles a través de, por ejemplo, Proligo LLC, 6200 Lookout Road, Boulder, CO 80301 EE.UU.

Los oligonucleótidos también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos pueden comprender uno de los siguientes en la posición 2' del azúcar: OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino puede ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituidos o no sustituidos, O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos más comprenden uno de los siguientes en la posición 2' : alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo que mejora las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta 78:486 [1995]) es decir, un grupo alcóxalcoxi. Una modificación adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxi (es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂), también conocido como 2'-DMAOE, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluro (2'-F). También pueden efectuarse modificaciones similares en otras posiciones de oligonucleótidos, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en oligonucleótidos enlazados en 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobase (normalmente citadas en la técnica simplemente como "base"). Tal como se usa en el presente documento, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-propinil-6-fluorouracilo, 5-metilthiazoleuracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 3-desazaguanina, 3-desazaadenina, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-propin-7-desazaadenina, 7-propin-7-desazaguanina, 2-cloro-6-aminopurina, 4-acetilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, 5-(carboxihidroxil-metil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouacilo, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propiladenina y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-aminoadenina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-6-isopenteniladenina, metiléster del ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 2-tiotimina, 5-halouracilo, 5-halocitosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, 8-halo, 8-amino; 8-tiol, 8-hidroxil y otras adeninas y guaninas sustituidas en la posición 8, 5-trifluorometiluracilo y citoxina, metiléster del ácido n-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, queosina, xantina, hipoxantina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina. Las nucleobases adicionales incluyen aquellas divulgadas en la patente de EE.UU N° 3.687.808. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en -0,6-1,2 °C. Estas son particularmente eficaces cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Otras modificación de los oligonucleótidos de la presente invención implica la unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, pero sin limitación, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter (por ejemplo, hexil-S-tritilitio), un tiocolesterol, una cadena alifática (por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo), un fosfolípido, (por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio), una poliamina o una cadena de polietilenglicol o ácido adamantano acético, un resto de palmitilo, o un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Un experto en la materia relevante sabe bien cómo generar oligonucleótidos que contienen las modificaciones anteriormente descritas. La presente invención no está limitada a los oligonucleótidos descritos anteriormente. Puede utilizarse cualquier modificación o sustitución adecuada.

No es necesario que todas posiciones en un compuesto dado estén modificadas de manera uniforme, y de hecho

más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas pueden incorporarse en un solo compuesto o incluso en un solo nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos oligoméricos de la presente invención tal como se describen a continuación.

5

5. Cócteles

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona cócteles que comprenden dos o más oligonucleótidos dirigidos hacia regiones reguladoras de genes (por ejemplo, oncogenes). En algunas realizaciones, dos o más oligonucleótidos hibridan con regiones diferentes de una región reguladora del mismo gen. En otras realizaciones, los dos o más oligonucleótidos hibridan con regiones reguladoras de dos genes diferentes. La presente invención no se limita a un mecanismo particular. De hecho, no es necesario un entendimiento del mecanismo para poner en práctica la presente invención. Sin embargo, se contempla que la combinación de dos o más compuestos de la presente invención proporcione una inhibición del crecimiento de células cancerosas que sea mayor que la inhibición aditiva de cada uno de los compuestos administrados por separado.

15

Los compuestos oligonucleotídicos de la presente invención pueden usarse solos o en combinación con un agente quimioterapéutico, radioterapia o cirugía.

20 **B. Agentes quimioterapéuticos**

Los agentes quimioterapéuticos de la presente invención pueden incluir cualquier fármaco quimioterapéutico adecuado o combinaciones de fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, un cóctel). Los agentes quimioterapéuticos ejemplares incluyen, sin limitación, agentes alquilantes, platinos, antimetabolitos, antraciclinas, taxanos, camptotecinas, nitrosoureas, inhibidores de EGFR, antibióticos, inhibidores de HER2/neu, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de cinasas, inhibidores de proteasoma, inmunoterapias, terapias hormonales, terapias fotodinámicas, vacunas para el cáncer, inhibidores de histona desacetilasa, moduladores de esfingolípidos, oligómeros, otros fármacos quimioterapéuticos no clasificados y combinaciones de los mismos.

25

30 1. Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son agentes quimioterapéuticos que se cree que atacan a los sitios cargados negativamente en el ADN (por ejemplo, los átomos de oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre) y se unen al ADN alterando de este modo la replicación, transcripción e incluso el emparejamiento de bases. También se cree que la alquilación del ADN también da lugar a roturas de la hebra de ADN y a la reticulación de la hebra de ADN. Mediante la alteración del ADN de este modo, se detiene de manera eficaz la actividad celular y la célula cancerosa morirá. Los agentes alquilantes comunes incluyen, sin limitación, procarbazona, ifosfamida, ciclofosfamida, melfalano, clorambucilo, dacarbacina, busulfán, tiotepa, y similares. Los agentes alquilantes tales como aquellos mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más agentes alquilantes distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

35

40

2. Platinos

Se cree que los agentes quimioterapéuticos de platino inhiben la síntesis, la transcripción y la función del ADN mediante reticulación de las unidades de ADN. (La reticulación puede suceder bien entre dos hebras o dentro de una misma hebra de ADN). Los agentes quimioterapéuticos de platino comunes incluyen, sin limitación, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, eloxatino y similares. Los agentes quimioterapéuticos de platino tales como aquellos mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más platinos distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

45

50

3. Antimetabolitos

Se cree que los agentes quimioterapéuticos antimetabolitos interfieren con las rutas metabólicas normales, incluyendo aquellas necesarias para producir nuevo ADN. Los antimetabolitos comunes incluyen, sin limitación, metotrexato, 5-fluorouracilo (por ejemplo, capecitabina), gemcitabina (monocloridrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β), Eli Lilly), 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, cladribina, citarabina, tegafur, raltitrexed, arabinósido de citosina, y similares. El nitrato de galio es otro antimetabolito que inhibe a las reductasas de ribonucleótidos. Los antimetabolitos, tales como aquellos mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más antimetabolitos distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

55

60

4. Antraciclinas

Se cree que las antraciclinas promueven la formación de radicales de oxígeno libre. Estos radicales dan como resultado roturas de la hebra de ADN y la posterior inhibición de la síntesis y función del ADN. También se cree que las antraciclinas inhiben a la enzima topoisomerasa formando un complejo con la enzima y ADN. Las antraciclinas,

65

comunes incluyen, sin limitación, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, mitoxantrona, adriamicina, bleomicina, mitomicina-C, dactinomicina, mitramicina y similares. Las antraciclinas, tales como aquellas mencionadas anteriormente, pueden usarse en combinación con una o más antraciclinas distintas y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

5

5. Taxanos

Se cree que los taxanos se unen con elevada afinidad a los microtúbulos durante la fase M del ciclo celular e inhiben su función normal. Los taxanos comunes incluyen, sin limitación, paclitaxel, docetaxel, taxotere, taxol, taxasm, 7-epipaclitaxel, t-acetil paclitaxel, 10-desacetil-paclitaxel, 10-desacetil-7-epipaclitaxel, 7-xilosilpaclitaxel, 10 desacetil-7-epipaclitaxel, 7-N-N-dimetilglicilpaclitaxel, 7-L-alanilpaclitaxel y similares. Los taxanos, tales como aquellos mencionados anteriormente, pueden usarse en combinación con uno o más taxanos distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

10

6. Camptotecinas

Se cree que las camptotecinas forman complejos con topoisomerasas y ADN dando como resultado la inhibición y función de esta enzima. Además se cree que la presencia de topoisomerasa es necesaria para continuar la síntesis de ADN. Las camptotecinas comunes incluyen, sin limitación, irinotecán, topotecán, etopósido, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina o vinorelbina), amsacrina, tenipósido y similares. Las camptotecinas tales como las mencionadas anteriormente pueden usarse en combinación con una o más camptotecinas distintas y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

20

7. Nitrosoureas

Se cree que las nitrosoureas inhiben los cambios necesarios para la reparación del ADN. Las nitrosoureas comunes incluyen, sin limitación, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina y similares. Las nitrosoureas, tales como las mencionadas anteriormente, pueden usarse en combinación con una o más nitrosoureas distintas y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

25

30

8. Inhibidores de EGFR

Se cree que los inhibidores de EGFR (es decir, receptor del factor de crecimiento epidérmico) inhiben a EGFR e interfieren con las respuestas celulares, incluyendo la proliferación y diferenciación celular. Los inhibidores de EGFR incluyen moléculas que inhiben la función la producción de uno o más EGFR. Estos incluyen inhibidores de molécula pequeña de los EGFR, anticuerpos para los EGFR, oligómeros antisentido, inhibidores de ARNi y otros oligómeros que reducen la expresión de los EGFR. Los inhibidores de EGFR comunes incluyen, sin limitación, gefitinib, erlotinib (Tarceva®), Cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix™, Amgen), lapatinib (GlaxoSmithKline), C11033 o PD183805 o Canertinib (6-acrilamida-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina, Pfizer), y similares. Oros inhibidores incluyen PKI-166 (4-[(1R)-1-feniletilamino]-6-(4-hidroxifenil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina, Novartis), CL-387785 (N-[4-(3-bromoanilino)quinazolin-6-il]but-2-inamida), EKB-569 (4-(3-cloro-4-fluororanilino)-3-ciano-6-(4-dimetilaminobut2(E)-enamido)-7-etoxiquinolona, Wyeth), lapatinib (GW2016, GlaxoSmithKline), EKB509 (Wyeth), Panitumumab (ABX-EGF, Abgenix), matuzumab (EMD 72000, Merck), y el anticuerpo monoclonal RH3 (New York Medical). Los inhibidores de EGFR tales como los mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más inhibidores distintos de EGFR y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una clase diferente.

35

40

45

9. Antibióticos

Se cree que los antibióticos promueven la formación de radicales de oxígeno libre que dan como resultado roturas de ADN ocasionan la muerte de las células cancerosas. Los antibióticos comunes incluyen, sin limitación, bleomicina y rapamicina y similares. El macrólido fungicida rapamicina (también denominado RAP, rapamune y sirolimus) se une intracelularmente a la proteína de unión 12 a inmunofilina FK506 (FKBP12) y el complejo resultante inhibe la actividad serina proteína cinasa de la diana de mamífero de rapamicina (mTOR). Los macrólidos de rapamicina incluyen formas de origen natural de rapamicina así como análogos de rapamicina y derivados que se dirigen e inhiben a mTOR. Otros macrólidos de rapamicina incluyen, sin limitación, temsirolimus (CCI-779, Wyeth), everolimus y ABT-578. Los antibióticos tales como los mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más antibióticos distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

50

55

10. Inhibidores de HER2/neu

Se cree que los inhibidores de HER2/neu bloquean el receptor de HER2 y previenen la cascada de reacciones necesarias para la supervivencia tumoral. Los inhibidores de Her2 incluyen moléculas que inhiben la función o producción de Her2. Estos incluyen inhibidores de molécula pequeña de Her2, anticuerpos para Her2, oligómeros antisentido, inhibidores de ARN y otros oligómeros que reducen la expresión de tirosina cinasas. Los inhibidores de HER2/neu comunes incluyen, sin limitación, trastuzumab (Herceptin®, Genentech) y similares. Otros inhibidores de

65

Her2/neu incluyen anticuerpos biespecíficos MDX-210(FCyR1-Her2/neu) y MDX-447 (Medarex), pertuzumab (rhuMAb 2C4, Genentech). Los inhibidores de HER2/neu tales como los mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más inhibidores de HER2/neu distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

5

11. Inhibidores de la angiogénesis

Se cree que los inhibidores de la angiogénesis inhiben al factor del crecimiento endotelial vascular, es decir, VEGF, inhibiendo de este modo la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para la supervivencia tumoral. Los inhibidores de VEGF incluyen moléculas que inhiben la función o producción de uno o más VEGF. Estos incluyen inhibidores de molécula pequeña de VEGF, anticuerpos para VEGF, oligómeros antisentido, inhibidores de ARNi y otros oligómeros que reducen la expresión de tirosinacinasas. Los inhibidores comunes de la angiogénesis incluyen, sin limitación, bevacizumab (Avastin®, Genentech). Otros inhibidores de la angiogénesis incluyen, sin limitación, ZD6474 (AstraZeneca), Bay-43-9006, sorafenib (Nexavar, Bayer), semaxamib (SU5416, Pharmacia), SU6668 (Pharmacia), ZD4190 (*N*-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etoxi]quinazolin-4-amina, Astra Zeneca), Zactima™ (ZD6474, *N*-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etoxi]quinazolin-4-amina, Astra Zeneca), Vatalanib, (PTK787, Novartis), el anticuerpo monoclonal IMC-1C11 (Imclone) y similares. Los inhibidores de la angiogénesis tales como los mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más inhibidores de la angiogénesis distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

20

12. Otros inhibidores de cinasas

Además de los inhibidores de EGFR, HER2 y VEGF se usan otros inhibidores de cinasas como agentes quimioterapéuticos. Los inhibidores de cinasa Aurora incluyen, sin limitación, compuestos tales como 4-(4-N benzoilamino)anilina)-6-metoxi-7-(3-(1-morfolino)propoxi)quinazolina (ZM447439, Ditchfield *et al.*, J. Cell. Biol., 161:267-80 (2003)) y hesperadina (Haaf *et al.*, J. Cell Biol., 161: 281-94 (2003)). Otros compuestos adecuados para su uso como inhibidores de cinasa Aurora se describen en Vankayalapati H, *et al.*, Mol. Cancer Ther. 2:283-9 (2003). Los inhibidores de cinasa SRC/Ab1 incluyen, sin limitación, AZD0530 (4-(6-cloro-2,3-metilendioxi-anilino)-7-[2-(4-metilpiperacina-1-il)etoxi]-5-tetrahidropiran-4-iloxiquinazolina). Los inhibidores de tirosina cinasas incluyen moléculas que inhiben la función o producción de una o más tirosina cinasas. Estos incluyen inhibidores de molécula pequeña de tirosina cinasas, anticuerpos para tirosina cinasas y oligómeros antisentido, inhibidores de ARNi y otros oligómeros que reducen la expresión de tirosina cinasas. CEP-701 y CEP-751 (cefalón) actúan como inhibidores de tirosina cinasas. El mesilato de imatinib es un inhibidor de tirosina cinasa que inhibe a *bcr-abl* uniéndose al sitio de unión a ATP de *bcr-abl* e inhibe de manera competitiva la actividad enzimática de la proteína. Aunque el imatinib es bastante selectivo para *bcr-abl*, también inhibe a otras dianas tales como c-kit y PDGF-R. Los inhibidores de FLT-3 incluyen, sin limitación, tandutinib (MLN518, Millenium), Sutent (SU11248, [2-dietilaminometil]amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-(3*Z*)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxílico, Pfizer), midostaurina (4'-N-Benzoil estaurosporina, Novartis), lefunomida (SU101) y similares. Los inhibidores de MEK incluyen, sin limitación, 2-(2-Cloro-4-yodo-fenilamino)-*N*-ciclo-propilmetoxi-3,4-difluoro-benzamida) (PD184352/Ci-1044, Pfizer), PD198306 (Pfizer), PD98059 (2'-amino-3'-metoxiflavona), UO126 (Promega), Ro092210 a partir de extractos microbianos fermentados (Roche), lactona del ácido resorcíclico, L783277, también aislado a partir de extractos microbianos (Merck) y similares. Los inhibidores de tirosina cinasa tales como aquellos mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más inhibidores de tirosina cinasa distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

45

13. Inhibidores del proteasoma

Se cree que los inhibidores del proteasoma inhiben la rotura de algunas de estas proteínas que se han marcado para su destrucción. Esto da como resultado una detención del crecimiento o muerte de la célula. Los inhibidores del proteasoma comunes incluyen, sin limitación, bortezomib, ortezomib y similares. Los inhibidores del proteasoma tales como aquellos mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con otros uno o más inhibidores del proteasoma y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una clase diferente.

50

14. Inmunoterapias

Se cree que las inmunoterapias se unen y bloquean dianas específicas, alterando de este modo la cadena de sucesos necesaria para la proliferación de células tumorales. Las inmunoterapias comunes incluyen, sin limitación, rituximab y otros anticuerpos dirigidos contra CD20, campath-1H y otros anticuerpos dirigidos contra CD-50, epratuzumab y otros anticuerpos dirigidos contra CD-22, galiximab y otros anticuerpos dirigidos contra CD-80, apolizumab HU1D10 y otros anticuerpos dirigidos contra HLA-DR, y similares. Pueden conjugarse radioisótopos al anticuerpo, dando como resultado radioinmunoterapia. Dos de estos productos anti-CD20 son tositumomab (Bexxar) e ibritumomab (Zevalin). Las inmunoterapias, tales como aquellas mencionadas anteriormente, pueden usarse en combinación con una o más inmunoterapias distintas y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

65

15. Terapias hormonales

Se cree que las terapias hormonales bloquean los receptores celulares, inhiben la producción *in vivo* de hormonas, y/o eliminan o modifican a los receptores de hormonas sobre las células, dando como resultado todo ello una aminoración o una detención de la proliferación tumoral. Las terapias hormonales comunes incluyen, sin limitación, antiestrógenos, (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, fulvestrant, raloxifeno, droloxifeno, idoxifeno y similares), progestógenos (por ejemplo, acetato de megestrol y similares), inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol, exemestano, vorazol, exemestano, fadrozol, aminoglutetimida, exemestano, 1-metil-1,4-androstadien-3,17-diona y similares), anti-andrógenos (por ejemplo, bicalutimida, nilutamida, flutamida, acetato de ciproterona, y similares), agonista de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (agonista de LHRH) (por ejemplo, goserelina, leuprolida, buserelina y similares); inhibidores de 5- α -reductasa tales como finasteride, y similares. Las terapias hormonales tales como aquellas mencionadas anteriormente pueden usarse en combinación con una o más terapias hormonales distintas y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

16. Terapias fotodinámicas

Las terapias fotodinámicas exponen a un fármaco fotosensibilizante a longitudes de ondas específicas de luz para eliminar células cancerosas. Las terapias fotodinámicas comunes incluyen, por ejemplo, porfímero sódico (por ejemplo, Photofrin®) y similares. Las terapias fotodinámicas tales como aquellas mencionadas anteriormente pueden usarse en combinación con una o más terapias fotodinámicas distintas y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

17. Vacunas para el cáncer

Se cree que las vacunas para el cáncer utilizan células tumorales inactivadas enteras, proteínas enteras, fragmentos de péptidos, vectores virales y similares para generar una respuesta inmunitaria que se dirija a las células cancerosas. Las vacunas para el cáncer común incluyen, sin limitación, células tumorales modificadas, vacunas peptídicas, vacunas dendríticas, vacunas de vector viral, vacunas de proteína de choque térmico y similares.

18. Inhibidores de histona desacetilasa

Los inhibidores de histona desacetilasa son capaces de modular la actividad transcripcional y, por consiguiente, pueden bloquear la angiogénesis y el ciclo celular, y promover la apoptosis y la diferenciación. Los inhibidores de histona desacetilasa incluyen, sin limitación, SAHA (ácido suberoilánilida hidroxámico), depsipéptido (FK288) y análogos, Pivanex (Titan), CI994 (Pfizer), MS275 PXD101 (CuraGen, TopoTarget) MGCD0103 (MethylGene), LBH589, NVP-LAQ824 (Novartis) y similares y se han usado como agentes quimioterapéuticos. Los inhibidores de histona desacetilasa tales como aquellos mencionados anteriormente pueden usarse en combinación con uno o más inhibidores de histona desacetilasa distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

19. Moduladores de esfingolípidos

Se ha demostrado que los moduladores del metabolismo de esfingolípidos inducen la apoptosis. Para una revisión, véase N.S. Radin, *Biochem J*, 371:243-56 (2003); D.E. Modrak, *et al.*, *Mol. Cancer Ther*, 5:200-208 (2006), K. Desai, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1585:188-92 (2002) y C.P. Reynolds, *et al.* y *Cancer Lett*, 206, 169-80 (2004), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Los moduladores e inhibidores de varias enzimas implicadas en el metabolismo de los esfingolípidos pueden usarse como agentes quimioterapéuticos.

(a) Se ha demostrado que la ceramida induce la apoptosis, por consiguiente, se ha usado ceramida exógena o un análogo de ceramida de cadena corta tal como N-acetilesfingosina (C₂-Cer), C₆-Cer o C₈-Cer. Otros análogos incluyen, sin limitación, 1-glucurónido de Cer, ceramidas derivatizadas con poli(etilenglicol) y ceramidas pegiladas.

(b) Se ha usado moduladores que estimulan la síntesis de ceramida para aumentar los niveles de ceramida. Los compuestos que estimulan a la serina palmitoiltransferasa, una enzima implicada en la síntesis de ceramida, incluyen, sin limitación, tetrahidrocannabinol (THC) y análogos sintéticos y anandamida, un cannabinoide de mamífero de origen natural. La gemcitabina, el ácido retinoico y un derivado, fenretinida [N-(4-hidroxifenil)retinamida, (4-HPR)], camptotecina, homocamptotecina, etopósido, paclitaxel, daunorubicina y fludarabina también han demostrado aumentar los niveles de ceramida. Además, valspodar (PSC833, Novartis), un análogo no nefrotóxico no inmunosupresor de ciclosporina y un inhibidor de p-glucoproteína, aumenta los niveles de ceramida.

(c) Los moduladores de esfingomielinasas pueden aumentar los niveles de ceramida. Estos incluyen compuestos que disminuyen los niveles de GSH, ya que GSH inhibe a las esfingomielinasas. Por ejemplo, la betatina (disulfuro de β -alanil cisteamina), oxidada a GSH, y ha producido buenos efectos en pacientes con mieloma, melanoma y cáncer de mama. Los inhibidores de COX-2, tales como celecoxib, quetoconazol, un agente antifúngico, doxorubicina, mitoxantrona, D609 (tricloclodecan-9-il-xantogenato), dexametasona, y Ara-C (1- β -D-arabinofuranosilcitosina) también estimulan a las esfingomielinasas.

(d) Las moléculas que estimulan la hidrólisis de la glucosilceramida también elevan los niveles de ceramida. La enzima, GlcCer glucosidasa, que está disponible para su uso en la enfermedad de Gaucher, particularmente con retinol o pentanol como aceptores de glucosa y/o un activador de la enzima, pueden usarse como agentes terapéuticos. La saposina C y análogos de la misma, así como análogos del fármaco antipsicótico, cloropromacina, también pueden ser útiles.

(e) Los inhibidores de la síntesis de la glucosilceramida incluyen, sin limitación, PDMP (N-[2-hidroxi-1-(4-morfolinilmetil)-2-feniletildodecanamida]), PMPP (D,L-*treo*-(1-fenil-2-hexadecanoilamino-3-morfolino-1-propanol), P4 o PPPP (D-*treo*-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol), etilendioxi-P4, 2-decanoilamina-3-morfolinoprofenona, tamixofeno, raloxifeno, mifepristona (RU486), N-butildesoxinogiramicina y la quimioterapia antiandrógeno (bicalutamida + acetato leuprolida). Zavesca, (1,5-(butilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol) usado normalmente para tratar la enfermedad de Gaucher, es otro inhibidor de la síntesis de glucosilceramida.

(f) Los inhibidores de ceramida se incluyen, sin limitación, N-oleoiletanolamina, una forma troncada de la ceramida, D-MAPP (D-*eritro*-2-tetradecanoilamino-1-fenil-1-propanol) y el inhibidor relacionado B13 (*p*-nitro-D-MAPP).

(g) Los inhibidores de la esfingosina cinasa también dan como resultado niveles aumentados de ceramida. Los inhibidores incluyen, sin limitación, safangol (L-*treo*-dihidroesfingosina), N,N-dimetil esfingosina, trimetilesfingosina y análogos y derivados de esfingosina tales como dihidroesfingosina, y miriocina.

(h) Las fumonisinas y análogos de fumonisinas, aunque inhiben a la ceramida sintasa, también aumentan los niveles de esfingánina debido a la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos desde cero, dando como resultado apoptosis.

(i) Otras moléculas que aumentan los niveles de ceramida incluyen, sin limitación, miltefosina (hexadecilfosfolina). Los moduladores de esfingolípidos, tales como aquellos mencionados anteriormente, pueden usarse en combinación con uno o más moduladores de esfingolípidos distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

20. Oligómeros

Además de oligonucleótidos de la presente invención, se han usado otros oligonucleótidos como terapias para el cáncer. Estos incluyen Genasense (oblimersen, G3139, de Genta), un oligonucleótido antisentido que se dirige a bcl-2 y G4460 (LR3001, de Genta) otro oligonucleótido antisentido que se dirige a c-myb. Otros oligómeros incluyen, sin limitación, ARNpi, señuelos, oligonucleótidos de ARNi y similares. Los oligonucleótidos, tales como aquellos mencionados anteriormente, pueden usarse en combinación con uno o más inhibidores de oligonucleótidos distintos y/o con uno o más agentes quimioterapéuticos de una o más clases diferentes.

21. Otros fármacos quimioterapéuticos

Los agentes quimioterapéuticos no clasificados adicionales se describen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Agentes quimioterapéuticos no clasificados adicionales.

Nombre Genérico	Nombre Comercial	Fabricante
Aldesleucina (des-alanil-1, serina-125 interleucina-2 humana)	Proleukin	Chiron Corp., Emeryville, CA
Alemtuzumab (anticuerpo anti CD52 de IgG1κ)	Campath	Millennium and ILEX Partners, LP, Cambridge, MA
Alitretinoína (ácido 9-cis-retinoico)	Panretin	Ligand Pharmaceuticals, Inc., San Diego CA
Alopurinol (sal monosódica de 1,5-dihidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona)	Zyloprim	GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC
Altretamina (N,N,N',N',N",N",- hexametil-1,3,5-triazin-2, 4, 6-triamina)	Hexalen	US Bioscience, West Conshohocken, PA
Amifostina (etanotiol, 2-[(3-aminopropil)amino]-, dihidrogenofosfato (éster))	Ethyol	US Bioscience
Anastrozol (1,3-Benzenodiacetonitrilo, a, a, a', a'-tetrametil-5-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetilo))	Arimidex	AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE

ES 2 548 240 T3

Trióxido arsénico	Trisenox	Cell Therapeutic, Inc., Seattle, WA
Asparaginasa (aminohidrolasa de L-asparagina, tipo EC-2)	Elspar	Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
BCG vivo (preparación liofilizada de una cepa atenuada de <i>Mycobacterium bovis</i> (<i>Bacillus Calmette-Guérin</i> [BCG], subcepa Montreal)	TICE BCG	Organon Teknika, Corp., Durham, NC
Cápsulas de bexaroteno (ácido 4-[1-(5,6,7,8-tetrahidro-3,5,5,8,8-pentametil-2-naptalenil)etenil]benzoico)	Targretin	Ligand Pharmaceuticals
Gel de bexaroteno	Targretin	Ligand Pharmaceuticals
Implante de carmustina con polifeprosan 20	Gliadel Wafer	Guilford Pharmaceuticals, Inc., Baltimore, MD
Celecoxib (como bencenosulfonamida de 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-ilo])	Celebrex	Searle Pharmaceuticals, England
Clorambucilo (ácido 4-[bis(2cloroetil)amino]bencenobutanoico)	Leukeran	GlaxoSmithKline
Cladribina (2-cloro-2'-desoxi-b-D-adenosina)	Leustatin, 2-CdA	R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute, Raritan, NJ
Dacarbazina (5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida (DTIC))	DTIC-Dome	Bayer AG, Leverkusen, Germany
Dactinomicina, actinomicina D (actinomicina producida por <i>Streptomyces parvullus</i> , C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₆)	Cosmegen	Merck
Darbepoyetina alfa (péptido recombinante)	Aranesp	Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA
Denileucina difitox (péptido recombinante)	Ontak	Seragen, Inc., Hopkinton, MA
Dexrazoxano ((S)-4,4'-(1-metil-1,2-etanodiol)bis-2,6-piperazindiona)	Zinecard	Pharmacia & Upjohn Company
Propionato de dromostanolona (propionato de 17b-Hidroxi-2a-metil-5a-androstan-3-ona)	Dromostanolone	Eli Lilly & Company, Indianapolis, IN
Propionato de dromostanolona	Masterone para inyección	Syntex, Corp., Palo Alto, CA
Solución B de Elliott	Solución B de Elliott	Orphan Medical, Inc
Epoetina alfa (péptido recombinante)	Epogen	Amgen, Inc
Estramustina (estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol(17(beta))- 3-[bis(2-cloroetil)carbamato] 17-(dihidrogenofosfato), sal disódica, monohidrato, o estradiol 3-[bis(2-cloroetil)carbamato] 17-(dihidrogenofosfato), sal disódica monohidrato)	Emcyt	Pharmacia & Upjohn Company
Exemestano (6-metilenandrosta-1,4-dien-3, 17-diona)	Aromasin	Pharmacia & Upjohn Company

ES 2 548 240 T3

Filgrastim (r-metHuG-CSF)	Neupogen	Amgen, Inc
Floxuridina (intraarterial) (2'-desoxi-5-fluorouridina)	FUDR	Roche
Fulvestrant (7-alfa-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentilsulfinil)nonil]estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-beta-diol)	Faslodex	IPR Pharmaceuticals, Guayama, Puerto Rico
Ozogamicina de gemtuzumab (anti-CD33 hP67,6)	Mylotarg	Wyeth Ayerst
Hidroxiurea	Hydrea	Bristol-Myers Squibb
Ifosfamida (2-óxido de 3-(2-cloroetil)-2-[(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforina)	IFEX	Bristol-Myers Squibb
Mesilato de imatinib (metanosulfonato de 4-[(4-Metil-1-piperacil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamida)	Gleevec	Novartis AG, Basel, Switzerland
Interferón alfa-2a (péptido recombinante)	Roferon-A	Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ
Interferón alfa-2b (péptido recombinante)	Intron A (Betaseron liofilizado)	Schering AG, Berlin, Germany
Irinotecan HCl (trihidrato de clohidrato (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidinopiperidino)carboniloxi]-1H-pirano[3, 4': 6,7] indolicino[1,2-b]quinolin-3,14(4H,12H)diona)	Camptosar	Pharmacia & Upjohn Company
Letrozol (4,4'-(1H-1,2,4-Triazol-1-ilmetilen)dibenzonitrilo)	Femara	Novartis
Leucovorina (ácido L-Glutámico, N[4[[[2-amino-5-formil-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4oxo-6- pteridinil]metil]amino]benzoil], sal cálcica (1:1))	Wellcovorin, Leucovorin	Immunex, Corp., Seattle, WA
Levamisol HCl (monocloridrato de (-)-(S)-2,3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazo [2,1-b]tiazol, C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S·HCl)	Ergamisol	Janssen Research Foundation, Titusville, NJ
Lomustina (1-(2-cloro-etil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea)	CeeNU	Bristol-Myers Squibb
Mecloretamina, mostaza de nitrógeno (clorhidrato de 2-cloro-N-(2-cloroetil)-N-metiletanamina)	Mustargen	Merck
Acetato de megestrol 17 α (acetiloxi)-6-metilpregna-4,6-dien-3,20-diona	Megace	Bristol-Myers Squibb
Melfalano, L-PAM (4-[bis(2-cloroetil) amino]-L-fenilalanina)	-Alkeran	GlaxoSmithKline
Mercaptopurina, 6-MP (monohidrato de 1,7-dihidro-6H-purin-6-tiona)	Purinethol	GlaxoSmithKline
Mesna (sulfonato sódico de 2-mercaptoetano)	Mesnex	Asta Medica
Metotrexato (ácido N-[4-[[[2,4-diamino-6-pteridinil]metil]metilamino]benzoil]-L-glutámico)	Methotrexate	Lederle Laboratories
Metoxsalen (9-metoxi-7H-furo[3,2-g][1]-benzopiran-7-ona)	Uvadex	Therakos, Inc., Way Exton, Pa
Mitomicina C	Mutamycin	Bristol-Myers Squibb
mitomicina C	Mitozytrex	SuperGen, Inc., Dublin, CA

ES 2 548 240 T3

Mitotano (1,1-dicloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)etano)	Lysodren	Bristol-Myers Squibb
Mitoxantrona (diclorhidrato de 1,4-dihidroxi-5,8-bis[[2-[(2-hidroxietil)amino etil]amino]-9,10-antracenediona)	Novantrone	Immunex Corporation
Fenpropionato de nandrolona	Durabolin-50	Organo, Inc., West Orange, NJ
Nofetumomab	Verluma	Boehringer Ingelheim Pharma Germany
Oprelvekin (IL-11)	Neumega	Genetics Institute, Inc., Alexandria, VA
Pamidronato (ácido (3-amino-1-hidroxiopropiliden)bis-fosfónico, sal disódica, pentahidrato, (APD))	Aredia	Novartis
Pegademasa ((monometoxipolietilenglicol succinimidilo)11-17-adenosina desaminasa)	Adagen (Pegademasa Bovina)	Enzon Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ
Pegaspargasa (monometoxipolietilenglicol succinimidil L-asparaginasa)	Oncaspar	Enzon
Pegfilgrastim (conjugado covalente de G-CSF humano metionil recombinante (Filgrastim) y monometoxipolietilenglicol)	Neulasta	Amgen, Inc
Pentostatina	Nipent	Parke-Davis Pharmaceutical Co., Rockville, MD
Pipobromano	Vercyte	Abbott Laboratories, Abbott Park, IL
Plicamicina, Mitramicina (antibiótico producido por <i>Streptomyces plicatus</i>)	Mithracin	Pfizer, Inc., NY, NY
Quinacrina (6-cloro-9-(1-metil-4-dietil-amina)butilamino-2-metoxiacridina)	Atabrine	Abbott Labs
Rasburicasa (péptido recombinante)	Elitek	Sanofi-Synthelabo, Inc.,
Sargramostim (péptido recombinante)	Prokine	Immunex Corp
Estreptozocina (estreptozocina 2-desoxi-2-[[[(metilnitrosoamino)carbonil]amino]-a(y b)-D-glucopiranosina y 220 mg de ácido cítrico anhidro)	Zanosar	Pharmacia & Upjohn Company
Talco ($Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$)	Sclerosol	Bryan, Corp., Woburn, MA
Temozolomida (3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo[5,1-d]-as-tetracina-8-carboxamida)	Temodar	Schering
Tenipósido, VM-26 (4'-desmetilepipodofillotoxina 9-[4,6-O-(R)-2-teniliden-(beta)-D-glucopiranosido])	Vumon	Bristol-Myers Squibb
Testolactona ([dgr]-lactona del ácido 13-hidroxi-3-oxo-13,17-secoandrosta-1,4-dien-17-oico)	Teslac	Bristol-Myers Squibb
Tioguanina, 6-TG (2-amino-1,7-dihidro-6H-purin-6-tiona)	Thioguanine	GlaxoSmithKline
Tiotepa (Aziridina, sulfuro de 1,1',1"-fosfinotioilidintris-, o Tris (1-aziridinil) fosfina)	Thioplex	Immunex Corporation

Topotecán HCl (clorhidrato de (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4': 6,7]indolico[1,2-b]quinolin-3,14-(4H,12H)-diona)	Hycamtin	GlaxoSmithKline
Toremifeno (citrato de 2-(p-[(Z)-4-cloro-1,2-difenil-1-butenil]-fenoxi)-N,N-dimetiletilamina (1:1))	Fateston	Roberts Pharmaceutical Corp., Eatontown, NJ
Tositumomab, 131I Tositumomab (anticuerpo monoclonal inmunoterapéutico marino recombinante de IgG _{2a} lambda anti-CD20 (131I es un anticuerpo radioinmunoterapéutico))	Bexxar	Corixa Corp., Seattle, WA
Tretinoína, ATRA (ácido todo transretinoico)	Vesanoid	Roche
Mostaza de uracilo	Cápsulas de Mostaza de uracilo	Roberts Labs
Valrubicina, N-trifluoroacetiladriamicin-14-valerato ((2S-cis)-2-[1,2,3,4,6,11-hexahidro-2,5,12-trihidroxi-7metoxi-6,11-dioxo-[[42,3,6-tridesoxi-3-[(trifluoroacetil)-amino- α -L-lyxo-hexopiranosil]oxil]-2-naftaceniil]-2-oxoetil pentanoato)	Valstar	Anthra --> Medeva
Zoledronato, ácido zoledrónico (monohidrato del ácido (1-Hidroxi-2-imidazol-1-il-fosfonoetil) fosfónico)	Zometa	Novartis

22. Cócteles

- 5 Los agentes quimioterapéuticos pueden incluir cócteles de dos o más fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente. En varias realizaciones, un agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye dos o más agentes alquilantes, platinos, antimetabolitos, antraciclinas, taxanos, camptotecinas; nitrosoureas, inhibidores de EGFR, antibióticos, inhibidores de HER2/neu, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de cinasas, inhibidores de proteasoma, inmunoterapias, terapias hormonales, terapias fotodinámicas, vacunas para el cáncer, moduladores de esfingolípidos, oligómeros o combinaciones de los mismos.
- 10 En una realización, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye una inmunoterapia, un agente alquilante, una antraciclina, una camptotecina y prednisona. En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye rituximab, un agente alquilante, una antraciclina, una camptotecina y prednisona. En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye rituximab, ciclofosfamida, una antraciclina, una camptotecina y prednisona. En otras realizaciones más, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (por ejemplo, R-CHOPS).
- 15 En otra realización, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye doxorubicina, ifosfamida y Mesna.
- 20 En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye un antimetabolito y un taxano. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico incluye gemcitabina y Taxotere.
- En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye dacarbazina, mitomicina, doxorubicina y cisplatino.
- 25 En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye doxorubicina y dacarbazina.
- En realizaciones alternativas, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye un agente alquilante, una camptotecina, una antraciclina y dacarbazina. En otros ejemplos, el agente quimioterapéutico incluye ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dacarbazina.
- 30 En otras realizaciones más, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye un agente alquilante, metotrexato, un antimetabolito y una o más antraciclinas. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico incluye 5-fluorouracilo, metotrexato, ciclofosfamida, doxorubicina y epirubicina.
- 35 En otras realizaciones más, el agente quimioterapéutico es un cóctel que incluye un taxano y prednisona o estramustina. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede incluir docetaxel combinado con prednisona o estramustina.
- 40

En otra realización más, el agente quimioterapéutico incluye una antraciclina y prednisona. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede incluir mitoxantrona y prednisona.

5 En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico incluye un macrólido de rapamicina y un inhibidor de cinasas. El inhibidor de cinasas puede ser un inhibidor de EGFR, Her2/neu, VEGF, Aurora cinasa, SRC/Abl cinasa, tirosina cinasa y/o MEK.

En otra realización, el agente quimioterapéutico incluye dos o más moduladores de esfingolípidos.

10 En otra realización más, el agente quimioterapéutico incluye un oligómero, tal como Genasense y uno o más agentes alquilantes, platinos, antimetabolitos, antraciclinas, taxanos, camptotecinas, nitrosoureas, inhibidores de EGFR, antibióticos, inhibidores de HER2/neu, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de cinasas, inhibidores de proteasoma, inmunoterapias, terapias hormonales, terapias fotodinámicas, vacunas para el cáncer, moduladores de esfingolípidos o combinaciones de los mismos.

15 Además, el fármaco o fármacos quimioterapéuticos que componen el agente quimioterapéutico pueden administrarse en terapias combinadas con otros agentes, o pueden administrarse secuencialmente o concurrentemente al paciente.

20 C. Radioterapia

En varias realizaciones de la presente invención, se administra radioterapia además de la administración de un compuesto oligonucleotídico: la radioterapia incluye terapias de radiación tanto externas como internas.

25 1. Terapia de radiación externa

Las terapias de radiación externa incluyen dirigir rayos de alta energía (por ejemplo, rayos x, rayos gamma, y similares) o partículas (partículas alfa, partículas beta, protones, neutrones y similares) al cáncer y al tejido normal que lo rodea. La radiación se produce fuera del cuerpo del paciente en una máquina denominada acelerador lineal.

30 Las terapias de radiación externa pueden combinarse con quimioterapias, cirugía o compuestos oligonucleotídicos.

2. Terapia de radiación interna

35 Las terapias de radiación interna incluyen poner la fuente de los rayos de elevada energía dentro del cuerpo, tan próximo como sea posible a las células cancerosas: las terapias de radiación interna pueden combinarse con terapias de radiación externa, quimioterapias o cirugía.

La radioterapia puede administrarse con quimioterapia simultáneamente, concurrentemente o por separado. Además, la radioterapia puede administrarse con cirugía de manera simultánea, concurrente o por separado.

40 D. Cirugía

45 En realizaciones alternativas de la presente invención, se usa cirugía para eliminar tejido canceroso de un paciente. El tejido canceroso puede extirparse de un paciente usando cualquier procedimiento quirúrgico adecuado incluyendo, por ejemplo, laparoscopia, escalpelo, láser, tijeras y similares. En varias realizaciones, la cirugía se combina con quimioterapia. En otras realizaciones, la cirugía se combina con radioterapia. En otras realizaciones más, la cirugía se combina tanto con quimioterapia como con radioterapia.

50 III. Composiciones farmacéuticas

55 En un aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica comprende uno o más compuestos oligonucleotídicos y un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica comprende un compuesto oligonucleotídico que tiene la SEC ID N° 1250, 1251, 1252, o 1253; y uno o más de un agente alquilante, un platino, un antimetabolito, una antraciclina, un taxano, una camptotecina, una nitrosourea, un inhibidor de EGFR, un antibiótico, un inhibidor de HER2/neu, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de proteasoma, una inmunoterapia, una terapia hormonal, una terapia fotodinámica, una vacuna para el cáncer, otros agentes quimioterapéuticos tales como aquellos ilustrados en la Tabla 1, o combinaciones de los mismos.

60 En una realización, la composición farmacéutica comprende un compuesto oligonucleotídico y un agente quimioterapéutico incluyendo una inmunoterapia, un agente alquilante, una antraciclina, una camptotecina y prednisona. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende uno o más compuestos oligonucleotídicos que comprenden las SEC ID N° 2-281, 283-461, 463-935, 937-1080, 1082-1248, 1250-1254 y 1267-1477, y los complementos de las mismas; y un agente quimioterapéutico que incluye una inmunoterapia, un agente alquilante, una antraciclina, una camptotecina y prednisona. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende un compuesto oligonucleotídico y un agente quimioterapéutico que incluye rituximab, ciclofosfamida, una antraciclina, una camptotecina y prednisona. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende un oligonucleótido y

un agente quimioterapéutico que incluye rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (por ejemplo, R-CHOPS).

5 Otras realizaciones de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden (a) uno o más compuestos oligonucleotídicos y (b) un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación, aquellos listados anteriormente. Los fármacos antiinflamatorios, incluyendo, pero sin limitación los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y los corticosteroides y fármacos antivirales, incluyendo, pero sin limitación, ribavirina, vidaravina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en las composiciones de la invención. Dentro del alcance de esta invención también son útiles otros agentes quimioterapéuticos no oligonucleotídicos. Dos o más compuestos combinados pueden usarse juntos o de manera secuencial.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir opcionalmente medicamentos tales como anestesia, complementos nutricionales (por ejemplo, vitaminas, minerales, proteínas y similares), cromóforos, combinaciones de los mismos, y similares.

A. Formulaciones, administración y usos

20 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, mediante pulverización para inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, intraocular, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral" tal como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa. Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en este campo o usando agentes de dispersión humectante adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butano-diol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean de manera convencional aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión.

35 Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicérido son útiles en la preparación de soluciones inyectables ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de linaza, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes dispersantes similares que se usan de manera común en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. También pueden usarse para los fines de formulación otros tensioactivos usados de manera común tales como los Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan de manera común en la fabricación de formas de dosificación sólida líquida u otras.

45 Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos usados de manera común incluyen lactosa y almidón de maíz. Normalmente también se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral, en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz deshidratado. Cuando se necesitan suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

50 Como alternativa, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden administrarse en forma de supositorios para administración por vía rectal. Estas pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente adecuado no irritante que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se derrita en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

60 Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención también pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando la diana de tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, de la piel o del tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede efectuarse en una formulación de supositorio rectal (véase lo anterior) o en una formulación en enema adecuada. También pueden usarse parches transdérmicos tópicos.

65

Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse en una pomada adecuada que contiene al componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuestos de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en un o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, ésteres cetílicos, cera, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse como suspensiones micronizadas en suero salino estéril isotónico con pH ajustado, o preferentemente, como soluciones en suero salino estéril con pH ajustado isotónico, bien con o sin un conservante tal como cloruro de benzalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención también pueden administrarse mediante un aerosol nasal o por inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la materia de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico y otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se formulan para administración oral.

La cantidad de los compuestos de la presente invención que puede combinarse con los materiales vehículo para producir una composición en una forma de dosificación individual variarán dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Preferentemente, las composiciones deben formularse de tal forma que pueda administrarse una dosificación de entre 0,01-100 mg/kg de peso corporal/día del modulador a un paciente que reciba estas composiciones.

También debe entenderse que una dosificación y régimen de tratamiento específico para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad o el compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, y del juicio del médico a cargo del caso y de la gravedad de la enfermedad particular que se esté tratando. La cantidad de un compuesto de la presente invención en la composición también dependerá del compuesto particular en la composición.

Dependiendo de la afección particular, o enfermedad que se va a tratar o prevenir, también pueden estar presentes agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir dicha afección en las composiciones de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, los agentes terapéuticos adicionales administrados normalmente para tratar o prevenir una enfermedad particular, o afección, se conocen como "adecuados para la enfermedad, o afección, que se esté tratando".

B. Administración

Los compuestos oligonucleotídicos de la presente invención pueden administrarse usando cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, se administra ADN desnudo. En otras realizaciones, se utiliza lipofección para la administración de ácidos nucleicos a un sujeto. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos se modifican con fosfolípidos para su administración (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.169.177, incorporada en el presente documento por referencia).

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para su administración se compactan para ayudar en su captación (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6.008.366, 6.383.811 incorporadas en el presente documento por referencia). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos compactados se dirigen a un tipo celular particular (por ejemplo, célula cancerosa) mediante un resto de unión a célula diana (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.844.107, 6.077.835, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia).

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se conjugan con otros compuestos para ayudar a su administración. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se conjugan con polietilenglicol para ayudar en su administración (véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6.177.274, 6.287.591, 6.447.752, 6.447.753, y 6.440.743, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia). En otras realizaciones más, los oligonucleótidos se conjugan con copolímeros injertados protegidos, que son nanotransportadores de fármacos "cargables" (Pharmaln), descritos en la patente de Estados Unidos Nº 7.138.105, y en las publicaciones de Estados Unidos con números 2006/093660 y 2006/0239924, que se incorporan en el presente documento por referencia. En otras realizaciones adicionales, el transporte de los oligonucleótidos a las células se facilita mediante

conjugación a vitaminas (Endocyte, Inc, West Lafayette, IN; véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.108.921, 5.416.016, 5.635.382, 6.291.673 y el documento WO 02/085908; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia). En otras realizaciones, los oligonucleótidos se conjugan con nanopartículas (por ejemplo, NanoMed Pharmaceuticals; Kalamazoo, MI).

En otras realizaciones más, los oligonucleótidos se asocian con dendrímeros. Los dendrímeros son macromoléculas sintéticas con estructuras moleculares altamente ramificadas. Son estructuras dendríméricas representativas polímeros catiónicos tales como poliamidoamina Starburst (PAMAM), uno de los cuales, SuperFect[®], está disponible a través de Qiagen (Valencia, CA). Otros dendrímeros incluyen dendrímeros de poliéster descritos por Gillies, *et al.*, *Mol. Pharm.*, 2:129-38, 2005, que se incorpora en el presente documento por referencia; los dendrímeros de fenilacetileno, descritos en Janssen y Meijer, eds, *Síntesis de Polymers, Materials science and technology series*, Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GMBH, Capítulo 12, 1999, que se incorpora en el presente documento por referencia; dendrímeros de poli(L-lisina)-bloque-poli(etilenglicol)-bloque-poli(L-lisina) descritos por Choi, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 474-80, 2000, que se incorpora en el presente documento por referencia; dendrímeros anfífilos, descritos por Joester, *et al.*, *Angew Chem Int. Ed. Engl.*, 42:1486-90, 2003, que se incorpora en el presente documento por referencia; conjugados en forma de estrella de polietilenglicol, descritos por Liu *et al.*, *Polym Chem*, 37:3492-3503, 1999, que se incorpora en el presente documento por referencia; dendrímeros catiónicos que contienen fósforo descritos por Loup, *et al.*, *Chem Eur J*, 5:3644-50, 1999, que se incorpora en el presente documento por referencia; dendrímeros de poli(L-lisina), descritos por Ohasaki, *et al.*, *Bioconjug Chem*, 13:510-17, 2002, que se incorpora en el presente documento por referencia y dendrímeros asimétricos anfipáticos, descritos por Shah, *et al.*, *Int. J. Pharm.* 208:41-48, 2000, que se incorpora en el presente documento por referencia. Los dendrímeros de polipropileno descritos en Tack, *et al.*, *J. Drug Target*, 14:69-86, 2006, que se incorpora en el presente documento por referencia; y otros dendrímeros descritos anteriormente, pueden modificarse químicamente para reducir la toxicidad, por ejemplo, tal como se describe en Tack, *et al.*

Los dendrímeros forman complejos con ácidos nucleicos al igual que lo hacen otros polímeros catiónicos con alta densidad de carga. En general, la interacción dendrímero-ácido nucleico se basa en interacciones electrostáticas. Los dendrímeros pueden conjugarse con otras moléculas, tales como ciclodextrinas para aumentar la eficacia de la administración sistémica de complejos dendrímero-ácido nucleico. (Véase Dufes, *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.* 57, 2177-2202, 2005, y Svenson y Tomalia, *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 2106-29, 2005, ambos incorporados en el presente documento por referencia). Algunos dendrímeros tienen una estructura abierta flexible que puede capturar moléculas pequeñas en su interior y otros tienen un interior inaccesible. (Véase Svenson y Tomalia, *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 2106-29, 2005.)

En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos se secuestran en vesículas poliméricas. Las vesículas poliméricas pueden producirse a partir de una serie de materiales diferentes, pero en general se forman a partir de copolímeros de bloque, por ejemplo, poliestireno₄₀-poli(isociano-L-alanina-L-alanina)_m. (Véase, por ejemplo, Discher, *et al.*, *Science*, 297:967-73, 2002; Torchilin, *Cell. Mol. Life Sci*, 61:2549-59, 2004; Taubert, *et al.*, *Curr Opin Chem Biol*, 8:598-603, 2004; Lee, *et al.*, *Pharm. Res.*, 22:1-10, 2005; y Gaucher, *et al.*, *J. Control. Rel.* 109:169-88, 2005, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia). Las vesículas de copolímeros se forman a partir de una serie de moléculas, incluyendo, sin limitación, ácido poliacrílico-poliestileno, óxido de polietileno no iónico-polibutadieno, el tribloque (óxido de polietileno)₅-(poli[óxido de propileno])₆₈-(óxido de polietileno)₅, óxido de polietileno-poli(sulfuro de propileno), óxido de polietileno-poliactida, y polietilenglicol-poliisina. Muchos copolímeros, particularmente aquellos de copolímeros anfífilos o de carga opuesta incluyendo poliestileno₄₀-poli(isociano-L-alanina-L-alanina)_m, se autoensamblan formando vesículas en condiciones acuosas.

Los oligonucleótidos pueden cargarse en las vesículas poliméricas usando varios métodos. En primer lugar, el copolímero de bloque puede disolverse junto con los oligonucleótidos en un disolvente acuoso. Este método funciona bien con copolímeros moderadamente hidrófobos. En segundo lugar, para los copolímeros anfífilos que no son fácilmente solubles en agua, y en los casos en los que hay disponible un disolvente que solubiliza tanto a los oligonucleótidos como al copolímero, el oligonucleótido y el copolímero se disuelven en el disolvente y la mezcla se dializa frente a agua. Un tercer método implica la disolución tanto de los oligonucleótidos como del copolímero en una mezcla de agua/terc-butanol y la posterior liofilización de los disolventes. Las vesículas cargadas con oligonucleótidos se forman de manera espontánea cuando el nucleótido-copolímero liofilizado se reconstituye en un vehículo inyectable. (Dufresne, *et al.*, en Gurny, (ed.), *B.T. Gattefosse*, vol. 96, Gattefosse, Saint-Priest, p. 87-102, 2003, que se incorpora en el presente documento por referencia.)

Las vesículas poliméricas pueden dirigirse a células específicas anclando un ligando a la capa externa de las vesículas mediante una modificación posterior de un copolímero con una molécula espaciadora bifuncional o mediante la síntesis directa de copolímeros de bloque heterobifuncionales.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se atrapan en lípidos (por ejemplo, liposomas o micelas) para ayudar a su administración (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6.458.382, 6.429.200; las publicaciones de patentes de los Estados Unidos 2003/0099697, 2004/0120997, 2004/0131666, 2005/0164963, y la publicación internacional WO 06/048329, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia). Los liposomas incluyen, sin limitación, liposomas catiónicos basados en cardiolipina (por ejemplo, NeoPhectin, disponible

a través de NeoPharm, Forest Lake, IL) y liposomas sensibles al pH.

En algunas realizaciones de la presente invención, se utiliza NeoPhectin como el vehículo de administración liposomal. En algunas realizaciones, la NeoPhectin se formula con el oligonucleótido para reducir la NeoPhectin libre. En otras realizaciones, NeoPhectin está presente a una relación de carga de 6:1 o menos (por ejemplo, 5:1 y 4:1) de NeoPhectin a oligonucleótido.

En otras realizaciones, los lípidos, particularmente fosfolípidos que comprenden algunos liposomas, se conjugan con polietilenglicol o un derivado del mismo, para aumentar el tiempo que los liposomas circulan en la sangre después de la inyección intravenosa. (Véase por ejemplo, Moghimi, S.M. y Szebeni, J, Prog. Lipid Res., 42:463-78, 2003 y Li, W., *et al.*, J. Gene Med., 7:67-79, 2005, que se incorpora en el presente documento por referencia). Dichos liposomas, denominados "liposomas sigilosos" son capaces de evitar el sistema reticuloendotelial (RES), dando como resultado semividas de más de 24 horas en algunos casos. En una realización, los fosfolípidos y los liposomas se conjugan con moléculas de diortoéster de polietilenglicol, tal como se describe en Li, W., *et al.*, J. Gene Med., 7:67-79, 2005. En otras realizaciones, los liposomas-PEG se dirigen a receptores de células específicos. Por ejemplo, el haloperidol conjugado en el extremo distal de un fosfolípido enlazado a PEG en un liposoma catiónico dirigido a receptores sigma que se sobreexpresan en algunas células cancerosas tal como se describe en Mukherjee, *et al.*, J. Biol. Chem., 280, 15619-27, 2005, que se incorpora en el presente documento por referencia, la anisamida conjugada con fosfolípidos enlazados a PEG en liposomas también se dirige al receptor sigma. (Banerjee, *et al.*, Int. J. Cancer, 112, 693-700, 2004, que se incorpora en el presente documento por referencia.)

En otra realización, los oligonucleótidos pueden secuestrarse en vesículas de liposoma-copolímero híbridas, tal como se describen en Ruyschaert, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 127, 6242-47, 2005, que se incorpora en el presente documento por referencia. Por ejemplo, un copolímero tribloque anfífilo, que incluye poli(2-metiloxazolin)-bloque-poli(dimetilsiloxan)-bloque-poli(2-metiloxazolina) pueden interactuar con lípidos, incluyendo fosfolípidos para formar vesículas híbridas de liposoma-copolímero.

En otras realizaciones más, los oligonucleótidos están en complejo con polímeros adicionales para ayudar en su administración (véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6.379.966, 6.339.067, 5.744.335; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Por ejemplo, los polímeros de N-2-hidroxipropil metilacrilamida se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 2006/0014695, que se incorpora en el presente documento por referencia. Se describen polímeros catiónicos similares en la publicación de patente internacional WO 03/066054 y en la publicación de patente de Estados Unidos N° 2006/0051315, ambas incorporadas en el presente documento por referencia. Otros polímeros se describen por Intradigm Corp., Rockville, MD).

En otras realizaciones adicionales, el sistema de administración de alta presión controlada desarrollado por Mirus (Madison, WI) se utiliza para la administración de oligonucleótidos. El sistema de administración se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.379.966, que se incorpora en el presente documento por referencia.

V. Ejemplos de terapia para el cáncer

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben entenderse como limitantes del alcance de la misma.

EJEMPLO 1. (comparativo)

Administrar a un paciente un compuesto oligonucleotídico; un agente quimioterapéutico que incluya rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona; y radioterapia.

EJEMPLO 2. (comparativo)

Administrar a un paciente un compuesto oligonucleotídico, radioterapia y cirugía.

EJEMPLO 3. (comparativo)

Administrar a un paciente un compuesto oligonucleotídico, un agente quimioterapéutico y radiación.

EJEMPLO 4. (comparativo)

Administrar a un paciente un compuesto oligonucleotídico y un agente quimioterapéutico.

EJEMPLO 5. (comparativo)

Administrar a un paciente un compuesto oligonucleotídico, un agente quimioterapéutico, radioterapia y cirugía

EJEMPLO 6. Inhibición del crecimiento tumoral en xenoinjertos de PC-3 con PNT-100 y Taxotere™

Se examinó la inhibición del crecimiento tumoral mediante PNT-100 (SEC ID N° 1.251) usando el modelo subcutáneo de carcinoma de próstata PC-3 GFP humano. (Véase, por ejemplo, Yang *et al.*, Cancer Research 59, 781-786, [1999]; Glinkii *et al.*, Cancer Research 63, 4239-4243, [2003]; y Kalikin *et al.*, Cancer Biology y Therapy 2:6, 17-21 [2003]).

Las células PC-3 se transdujeron en primer lugar con el gen de la proteína fluorescente verde (GFP). Se adquirió un vector de expresión de GFP, pLEIN, a través de Clontech (Palo Alto, CA). El vector expresa GFP potenciada y el gen de resistencia a neomicina en el mismo mensaje bicistrónico que contiene un sitio de entrada al ribosoma interno. Para producir partículas virales cargadas con GFP, PT67, se usó una línea celular empaquetadora derivada de NIH3T3, que expresaba las envueltas virales 10 AI (Clontech). Las células PT67 se cultivaron en DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 %. Las células PT67, a un 70 % de confluencia, se incubaron con una mezcla precipitada de reactivo de sulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N-trimetilamonio metilo y cantidades saturantes de plásmido de pLEIN durante 18 h. Para la selección, las células se cultivaron en presencia de 200-1000 mg/ml de G418 durante días. Para la transducción del gen de GFP, las células PC-3 confluentes al 20 % (ATCC, CRL 1435) se incubaron con una mezcla precipitada a 1:1 de sobrenadantes retrovirales de células PT67 y F-12 K de Ham que contenía suero fetal bovino al 7 % durante 72 h. Se repuso con medio fresco en ese momento. Las células PC-3 se recogieron 72 h después de la transducción y se subcultivaron a una proporción de 1:15 en medio selectivo que contenía G-418. Se seleccionaron los clones de células PC-3 más brillantes que expresaban GFP, se combinaron, y después de amplificaron y transfirieron mediante métodos de cultivo convencionales.

Se prepararon reservas tumorales inyectando por vía subcutánea células PC-3-GFP a una concentración de 5×10^6 células/200 µl en el lateral de ratones desnudos (ratones desnudos NCr atímicos macho de entre 5 y 6 semanas de edad (Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research (Germantown, NY)). Antes de la recogida se comprobó la fuerte expresión de GFP de los tumores crecidos en el tejido subcutáneo de los ratones. Se inspeccionaron los tejidos tumorales recogidos de la zona subcutánea cultivados en ratones desnudos y se eliminó cualquier tejido tumoral de aspecto necrótico o con sospecha de estar necrótico o no de tumor de GFP. Los tejidos tumorales se cortaron posteriormente en pequeños fragmentos de aproximadamente 2 mm³. Se estableció una reserva tumoral de las PC-3 GFP de cáncer de próstata inyectando por vía subcutánea células PC-3 GFP en el costado de ratones desnudos. El tumor se mantuvo en ratones desnudos por vía subcutánea como reserva tumoral antes de su uso. Antes del implante, se confirmó mediante luz fluorescente la fuerte expresión de GFP del tumor PC-3 GFP. En el día del implante, se recogió el tumor del sitio subcutáneo y se puso en medio RPMI-1640. Se eliminaron los tejidos necróticos y los tejidos viables se cortaron en trozos de 2 mm³. Los fragmentos de tejido se implantaron entonces por vía subcutánea en el costado derecho del ratón desnudo. Se midió el tamaño tumoral controlando con un calibre. El volumen tumoral aproximado se calculó mediante la fórmula (ancho x longitud) x 1/2.

Se formularon PNT100 (SEC ID N° 1251) y PNT-1 (SEC ID N° 1488) con NeoPhectin-AT del modo siguiente. Se colocó a temperatura ambiente durante 15 min un frasco de vehículo de administración de liposomas de 25 ml (LDV) que consistía en NeoPhectin-AT (NeoPharm, IL). Se agitó el frasco suavemente durante 30 segundos para mezclar. Se transfirieron 1000 µl de LDV a tubos de polipropileno estériles de 50 ml marcados: día N° PNT100. El tubo de reserva de PNT100 se agitó vorticialmente y se centrifugó rápidamente. Se transfirieron 75 µl de PNT100 (reserva) al tubo de día N° PNT100 y la mezcla se agitó vorticialmente de manera vigorosa durante 2 minutos. Se mezclaron 5.000 µl dH₂O con 5000 µl de sacarosa al 20 % en un tubo estéril de 50 ml. 2150 µl de la sacarosa diluida se añadieron a la solución de PNT100/NeoPhectin-AT y se mezclaron. Se transfirió un volumen de inyección de fármaco adecuado a un tubo de polipropileno de 1,5 ml. El control de LDV se generó mezclando 75 µl de agua sin RNasa/DNasa en vez de PNT100 con 1000 µl de LDV, se añadieron 2150 de sacarosa al 10 % y la mezcla se inyectó.

Se inyectó por vía subcutánea NeoPhec-tin-AT-PNT-100 (SEC ID N° 1251) o PNT-1 (SEC ID N° 1488) a los ratones que portaban un volumen tumoral estimado de 50-100 mm³ en el tumor, a una dosis de 2,5-5,0 mg/kg a diario durante cinco días. Un segundo grupo de ratones recibió 5-10 mg/kg de Taxotere™ por vía intravenosa en los días 2 y 5. Un tercer grupo de ratones recibieron 5 mg/kg de NeoPhectin-AT-PNT-100 (SEC ID N° 1251) inyectado por vía subcutánea en el tumor a diario durante cinco días y 5-10 mg/kg de Taxotere™ inyectado por vía intravenosa en los días 2 y 5.

El diseño del estudio se muestra en la Tabla 3

Tabla 3

ID de subgrupo	Descripción	Dosis (mg/kg)	Pauta	Ruta	N
A	Control de PBS	200 ml	qd X 5	s.c	10

B	PNT-C (5'-NNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNN-3'; SEC ID N° 1448)+ LDV	5	qd X 5	s.c.	10
C	PNT-100 (PhoMabl2; SEC ID N° 1251) + LDV	2,5	qd X 5	s.c.	10
D	PNT-100 + LDV	5	qd X 5	s.c.	10
E	TAXOTERE™	10 y 5	Día 2 y 5	i.v.	10
F	TAXOTERE™ + PNT-100/LDV	10 y 5 + 5	Día 2 y 5 + qd X 5	1.v. + s.c.	10

El crecimiento tumoral se controló durante 40 días. Doce días después de la implantación, se efectuó una obtención de imágenes ópticas en todo el cuerpo de los tumores que expresaban GFP una vez a la semana usando un microscopio de fluorescencia. Los pesos tumorales finales se tomaron después de sacrificar a los animales en el día cuadragésimo sexto del estudio.

Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. La Figura 1 muestra el volumen tumoral medio de los tumores en el modelo subcutáneo del carcinoma de próstata PC-3 GFP después del tratamiento con PNT-100 y/o TAXOTERE™. La Figura 2 muestra el volumen final medio de los tumores. Los resultados indican que PNT-100 + TAXOTERE™ es más efectivo que PNT-100 o TAXOTERE™ por separado.

EJEMPLO 7 Inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de no Hodgkin con PNT-100 y vincristina

Se usó un modelo de s-linfoma no Hodgkin (NHL). El modelo WSU-DLCL₂ (linfoma de células grandes difusas de la Wayne State University) es un modelo muy robusto de linfoma de células grandes difusas humano agresivo quimiorresistente. Se obtuvo a través del Dr. Ramzi Mohammad y del Dr. Al-Katib y colaboradores en el Instituto del Cáncer Karmanos en la Wayne State University. (Véase Al-Katib, AM, *et al.*, Clin. Cancer Res. 4, 1305-1314 (1998); Mohammad, R, *et al.*, Clin. Cancer Res. 8, 1277-1283 (2002); Mohammad, RM, *et al.*, Mol. Cancer Ther., 4, 13-21 (2005); Mohammad, RM, *et al.*, Clin. Cancer Res. 6, 4950-4956, (2000)). El estudio se diseñó para administrar 5 dosis diarias de 5 mg/kg de PNT-100 (SEC ID N° 1.251), y en determinadas cohortes, terapia combinada con vincristina. Después de una dosis de PNT-100, se observó una pérdida de peso destacable en los animales inyectados con PNT100 y PNT-1 (SEC ID N° 1488). Los datos demuestran una carga tumoral disminuida con la terapia combinada con PNT-100 y PNT-1 20 días después del trasplante de WSU-DLCL₂. Los resultados indican que PNT-100, solo y en combinación con vincristina, disminuye el crecimiento de tumores en ratones.

EJEMPLO 8 Eficacia de la administración intravenosa de PNT-100 y Taxotere™ en el modelo de xenoinjerto de PC-3

Se generaron los xenoinjertos mediante inyección subcutánea de 2x10⁶ células PC-3 en ratones desnudos. Se preparó una relación de carga de PNT100:NeoPhectin AT de 6:1 tal como se describe en el Ejemplo 6. Se administró a los ratones que portaban xenoinjertos de 50-100 mm³ por vía intravenosa 1 mg/kg de PNT-100 + NeoPhectin AT, a diario durante 5 días, con 10 mg/kg en el día 2 y con 5 m/kg en el día 5 con Taxotere™. La respuesta tumoral se midió controlando con un calibre. Los resultados se muestran en la Figura 3, que indica que PNT-100 con Taxotere™ es más eficaz que PNT-100 o Taxotere™ por separado.

EJEMPLO 9 Eficacia de PNT-100 y Docetaxel liposomal en xenoinjertos de PC-3

Se generaron xenoinjertos mediante inyección subcutánea de 2x10⁶ células PC-3 en ratones desnudos. PNT-100 se formuló en una formulación lipídica de POPC/DOPE/MoChol/CHEMS a una relación molar de 6/24/47/23. (Véanse las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 2003/0099697, 2004/40120997, 2004/10131666, y la publicación de solicitud internacional N° WO/05/094783, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia). El tamaño medio de los liposomas es de menos de 160 nm, y la concentración de PNT-100 en la mezcla liposomal es de aproximadamente 2 mg/ml. Se usaron dos lotes diferentes de PNT-100 liposomal, 340.8 y 340.9. Los ratones que portaban xenoinjertos de 50-200 mm³ recibieron la dosificación el día 1 con PNT-100 (SEC ID N° 1251) o PNT100R (SEC ID N° 1288). La dosificación fue de 10 mg/kg en los días 1, 2 y 5 y de 7,5 mg/kg en los días 3 y 4. La dosificación de docetaxel fue de 10 mg/kg en el día 2 y de 5 mg/kg en el día 5. El análisis de Mann-Whitney con una prueba de t de student se efectuó con una confianza del 95 %. N = 5 excepto para 340.8 + docetaxel, en el que N = 4. Los resultados se muestran en la Figura 4 demostrando una reducción en el tamaño tumoral con PNT-100 + docetaxel en comparación con PNT-100 o docetaxel individualmente.

Una repetición del experimento dio resultados similares. Un lote de PNT-100 liposomal, denominado PNT-2253 se preparó con las mismas propiedades que antes. Se administró a los ratones que portaban xenoinjertos 10 mg/kg de PNT-100 liposomal (PNT2253) o PNT-100R liposomal (PNT2253R) mediante inyección en embolada i.v. a diario durante cinco días. La dosificación de docetaxel fue de 10 mg/kg en el día 2 y de 5 mg/kg en el día 5 mediante inyección en embolada i.v. El volumen tumoral se midió mediante un calibre. Los estudios se llevaron a cabo

cuando los xenoinjertos de los animales de control alcanzaron los 2000 mm³. Los resultados se muestran en la Figura 5 y 6, demostrando una inhibición del crecimiento tumoral del 80 % para PNT-100 + docetaxel. Un segundo lote de PNT-100 liposomal (PNT2252) se administró mediante infusión lenta i.v. La dosificación fue de 20 mg/kg a diario durante 5 días y se administró docetaxel a 10 mg/kg en el día 2 y a 5 mg/kg en el día 5 mediante inyección en embolada i.v. Los resultados en la Figura 6 muestran una inhibición del crecimiento tumoral del 49 % para PNT2252 + docetaxel a los 17 días después del tratamiento con el fármaco.

EJEMPLO 10 Eficacia de PNT-100 liposomal y Rituximab en xenoinjertos de WSU-DLCL2

Los xenoinjertos con células WSU-DLCL2 se generaron en ratones C.B-17 SCID de entre 4-6 semanas de edad tal como se describe en los ejemplos anteriores. Se formuló PNT-100 liposomal como en el Ejemplo 9 y tiene propiedades similares y una concentración de 2 mg de PNT-100 por ml. El rituximab de grado farmacéutico humano (Biogen Idec-Genentech) se proporcionó por el Karmanos Cancer Institute. Los ratones se trataron como en la Tabla 4.

Tabla 4

ID de Grupo	Descripción	Volumen de dosis de PNT-100 liposomal (Por 26 g/ratón)	Pauta	Ruta	n
A	Control de sacarosa al 10 %	125 µl	qd X 5	i.v.	8
B	PNT-100 liposomal 10 mg/kg	125 µl	qd X 5	i.v.	7*
C	Rituxan 20 mg/kg	NA	Día 2 y Día 5	i.v.	8
D	PNT-100 liposomal 10 mg/kg Rituxan 20 mg/kg	125 µl	qd X 5 Día 2 y Día 5	i.v.	8

Nota: Dosificación listada como mg/ml de PNT100
* Un animal no desarrolló tumores palpables.

Los animales se comprobaron tres veces a la semana respecto al crecimiento tumoral mediante medidas con un calibre. Se calculó un volumen tumoral aproximado usando la fórmula $1/2 (a \times b^2)$, donde b es el menor de dos diámetros perpendiculares. Los animales se sacrificaron cuando la carga tumoral individual del animal alcanzó los 2000 mm³ o cuando el estudio concluyó a los 81 días.

Rituximab a 20 mg/kg administrado en los días 2 y 5 dio como resultado una regresión completa del tumor, es decir, el tumor encogía por debajo del tamaño medible durante tres puntos de tiempo consecutivos en siete de ocho tumores y cuatro de ocho mostraron una regresión completa hasta el punto final de 81 días. PNT-100 liposomal a 10 mg/ml, administrado a diario durante cinco días, dio como resultado una regresión completa del tumor en uno de siete tumores y ninguno de los tumores mostró una regresión completa al final de los 81 días. Uno de siete tumores tenía una regresión parcial, que es una reducción de menos del 50 % respecto del tamaño tumoral inicial durante tres puntos de tiempo consecutivos. La administración de PNT-100 liposomal dio como resultado una reducción en la velocidad del crecimiento del tumor cuando se comparó con el control de sacarosa. PNT-100 liposomal administrado junto con rituximab (grupo D), dio como resultado una regresión completa del tumor en seis de ocho de los tumores, y 5 de 8 tumores mostraron una regresión completa al final de los 81 días. Los ocho tumores tuvieron regresiones parciales. Estos resultados no establecieron una sinergia de rituximab + PNT-100, en xenoinjertos de WSU-DLCL₂, probablemente debido a que los niveles de rituximab administrados fueron elevados.

EJEMPLO 11 Eficacia de PNT-100 liposomal y Rituximab en xenoinjertos de Daudi

Las células de Daudi son un modelo para el linfoma de Burkitt. Los xenoinjertos con células de Daudi se generaron en ratones tal como se describe en los ejemplos anteriores. Se formuló PNT-100 liposomal como en el ejemplo 9 y tiene propiedades similares y una concentración de 2,4 mg de PNT-100 por ml. Los ratones se dividieron en 10 grupos y se trataron como en la Tabla 5.

Tabla 5

ID de grupo	Descripción	Dosis (mg/kg)	Pauta	Ruta	N
1	Control de PBS	200 µl	qd X 5		
2	Rituximab	20 mg/kg	Pauta 2	i.v.	10

3	PNT-100 liposomal	30 mg/kg	Pauta 1	i.v.	10
4	PNT-100 liposomal	20 mg/kg	Pauta 1	i.v.	10
5	PNT-100 liposomal	13,3 mg/kg	Pauta 1	i.v.	10
6	PNT-100 liposomal	8,89 mg/kg	Pauta 1	i.v.	10
7	PNT-100 liposomal	5,92 mg/kg	Pauta 1	i.v.	10
8	Rituximab + PNT-100 liposomal	20 mg/kg RTX, 20 mg/kg PNT-100	Pauta 1-rituximab, Pauta 2-PNT-100	i.v.	10
9	Rituximab + PNT-100 liposomal	20 mg/kg RTX, 13,3 mg/kg PNT-100	Pauta 1-rituximab, Pauta 2-PNT-100	i.v.	10

La Pauta 1 son 5 dosis diarias, 2 días de descanso, después 5 dosis diarias, 2 días de descanso y después 3 dosis diarias. La Pauta 2 es administración i.v. de rituximab bisemanalmente durante 2,5 semanas durante un total de 5 inyecciones.

5

El volumen tumoral se midió mediante un calibre. Los estudios se terminaron cuando los xenoinjertos de los animales de control alcanzaron 2000 mm³. Los resultados se muestran en las Figuras 8-10. La Figura 7 muestra el volumen tumoral medio hasta 50 días. La Figura 8 es una representación de Kaplan-Meyer, que muestra el porcentaje de ratones cuyos tumores no han alcanzado todavía los 2000 mm³ cada día. La Figura 9 muestra el cambio en el peso corporal de los ratones en cada grupo. Los resultados muestran poco efecto con rituximab o PNT-100 solos, pero un efecto dramático cuando PNT-100 y rituximab se administran juntos. De hecho, en los xenoinjertos de Daudi, los tumores se encojen y desaparecen cuando los ratones que los portan se tratan con PNT-100 y rituximab.

10

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pronai

<120> TERAPIAS PARA EL CÁNCER Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS USADAS EN LAS MISMAS

20

<130> 125829/00029

<160> 1479

25

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1250

<211> 24

<212> ADN

30

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

35

<220>

<221> base_modificada

<222> (3)..(3)

<223> c o nucleótido de C metilado

40

<220>

<221> base_modificada

<222> (7)..(7)

<223> c o nucleótido de C metilado

45

<220>

<221> base_modificada

<222> (9)..(9)

<223> c o nucleótido de C metilado

50

<220>

<221> base_modificada

<222> (17)..(17)
 <223> c o nucleótido de C metilado

5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> C o nucleótido de C metilado

10
 <400> 1250
 cacgcacgcg catccccgcc cgtg 24

15
 <210> 1251
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> 59139245-59139268 (Localización en el cromosoma 18)

30
 <400> 1251
 cacgcacgcg catccccgcc cgtg 24

35
 <210> 1252
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> c o nucleótido de C metilado

50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> c o nucleótido de C metilado

55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> c o nucleótido de C metilado

60
 <400> 1252
 actcgacgac gtgtgtacgc gca 23

65
 <210> 1253
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

ES 2 548 240 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> 59139560-59139582 (Localización en el cromosoma 18)

5

<400> 1253
actcgagac gtgtgtacgc gca 23

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica que comprende:
- 5 un oligonucleótido y
un agente quimioterapéutico,
- en la que el oligonucleótido comprende la SEC ID N° 1251, o el complemento de la misma.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que están comprendidos uno o más agentes inmunoterapéuticos.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el agente quimioterapéutico comprende un taxano, una camptotecina, un antimetabolito, una antraciclina, un inhibidor de EGFR, un agente alquilante, un platino, una nitrosourea, un antibiótico, un inhibidor de Her2/neu, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor del proteasoma, una terapia hormonal, un inhibidor de aromatasas, un inhibidor de histona desacetilasa, un modulador de esfingolípidos, un inhibidor de cinasas o un oligómero.
- 15 4. La composición de la reivindicación 2, en la que el agente inmunoterapéutico comprende rituximab, tositumomab, ibritumomab, bevacizumab, trastuzumab o combinaciones de los mismos.
- 20 5. La composición de la reivindicación 1, en la que el agente quimioterapéutico comprende paclitaxel, docetaxel, irinotecán, topotecán, etopósido, vincristina, vinblastina, vinorelbina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, cladribina, citarabina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, mitoxantrona, gefitinib, erlotinib, cetuximab, mesilato de imatinib, lefunomida, midostaurina, goserelina, bicalutamida, leuprolida, bortezomib, ciclofosfamida, metotrexato, cisplatino, carboplatino, SU11248, dacarbacina o combinaciones de los mismos.
- 25 6. La composición de la reivindicación 1, en la que el agente quimioterapéutico comprende un cóctel que comprende una inmunoterapia, un agente alquilante, una antraciclina, una camptotecina y prednisona; o un cóctel que comprende rituximab, un agente alquilante, una antraciclina, una camptotecina y prednisona; o un cóctel que comprende rituximab, ciclofosfamida, una antraciclina, una camptotecina y prednisona; o un cóctel que comprende rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona; o un cóctel que comprende bicalutamida y acetato de leuprolida; o un cóctel que comprende docetaxel y prednisona; o un cóctel que comprende gemcitabina y docetaxel.
- 30 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende además un oligonucleótido adicional que comprende un oligómero seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID N° 1250, 1252, 1253 o los complementos de las mismas.
- 35 8. La composición de la reivindicación 7, en la que el oligonucleótido adicional comprende la SEC ID N° 1250.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la longitud del oligonucleótido es de 15 a 35 nucleótidos.
- 40 10. Una composición que comprende un oligonucleótido que comprende la SEC ID N° 1251 y rituximab.
11. Una composición que comprende un oligonucleótido que comprende la SEC ID N° 1251 y docetaxel.
12. Una composición que comprende un oligonucleótido que comprende la SEC ID N° 1251 y vincristina.
- 45 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en un método para tratar el cáncer.
14. La composición para el uso de la reivindicación 13, en donde el método de tratamiento comprende: (a) administrar a un paciente una cantidad eficaz de un oligonucleótido que comprende la SEC ID N° 1251 o el complemento de la misma; y (b) administrar al paciente una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.
- 50 15. La composición para el uso de las reivindicaciones 13 o 14, en donde el tratamiento comprende además radioterapia o extirpar el tejido canceroso.
- 60 16. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en la que el medicamento comprende además un oligonucleótido adicional que comprende una cualquiera de las SEQ ID N° 1250, o 1252-1253.
17. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en la que el cáncer se selecciona entre linfoma, leucemia, linfoma de células B folicular, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica del tipo de células pre-B, neuroblastoma, carcinoma nasofaríngeo, adenocarcinoma de próstata, de mama o de colon y cáncer de próstata.
- 65

18. Un oligonucleotídico que comprende las SEC ID N° 1250 o 1251 y un agente quimioterápico que comprende rituximab, docetaxel y vincristina para su uso en el tratamiento de un cáncer.

FIGURA 1

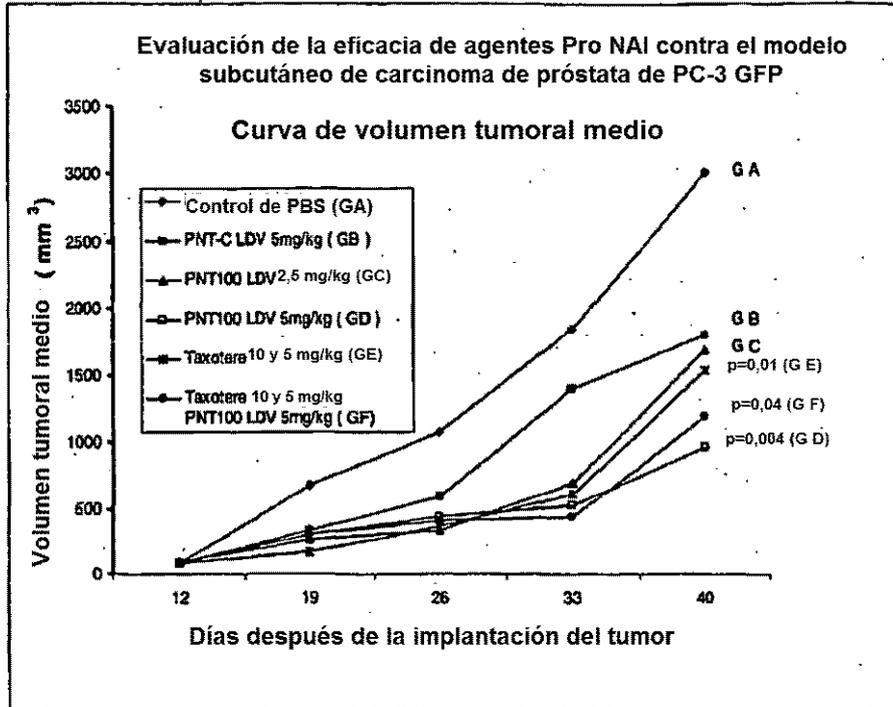
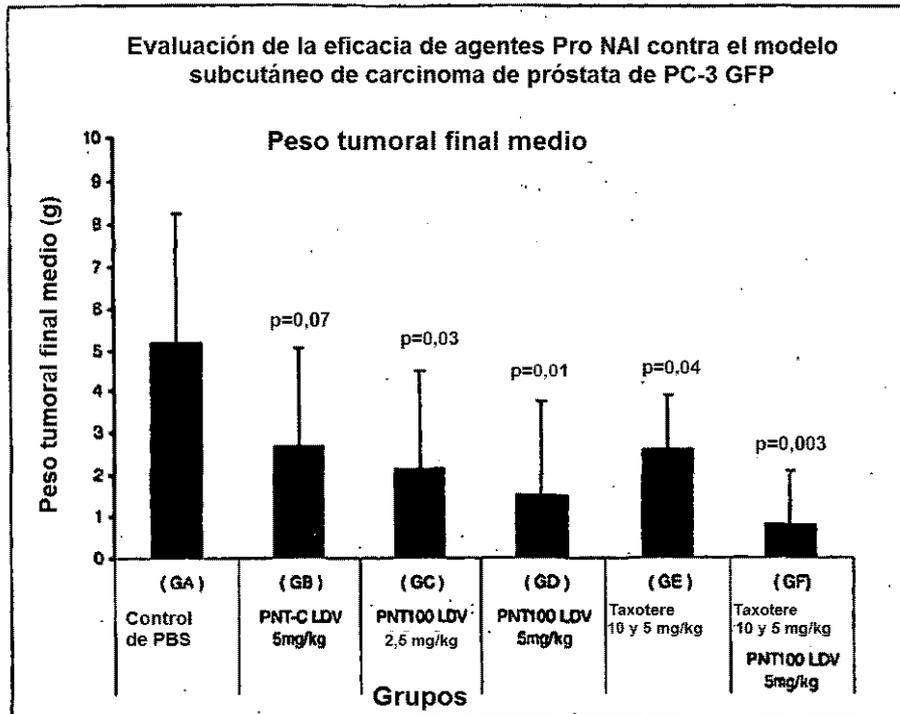


FIGURA 2



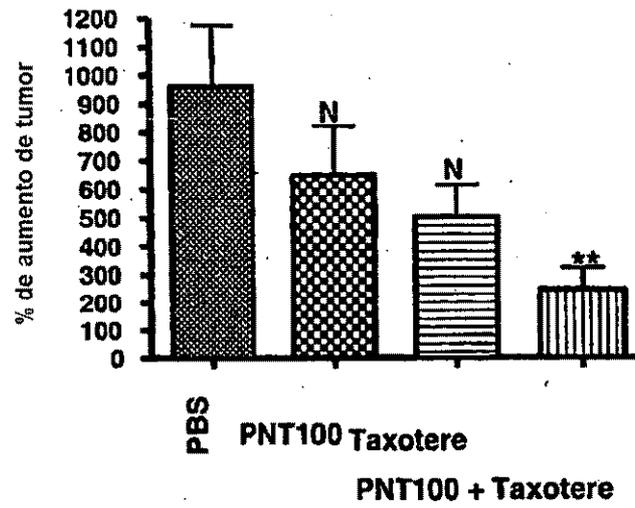


Figura 3, véase la figura en Power point por separado

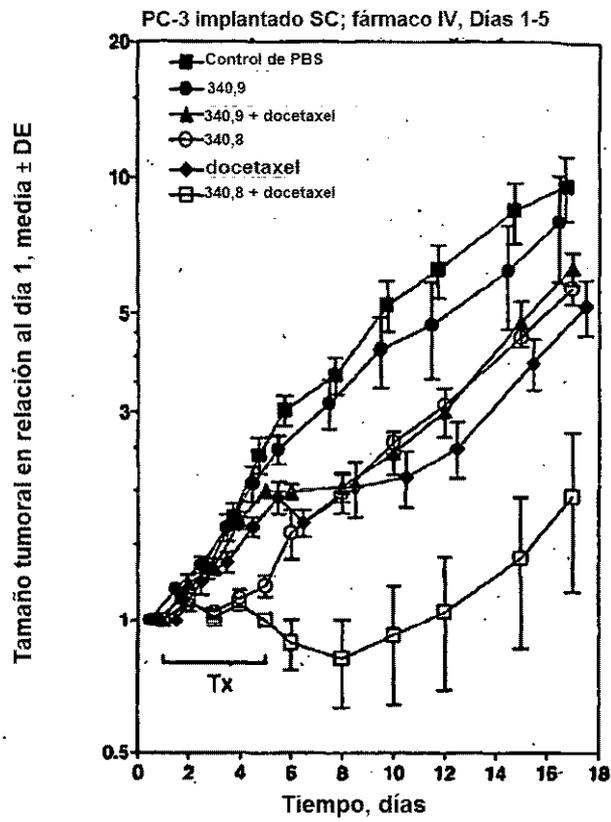


FIGURA 4

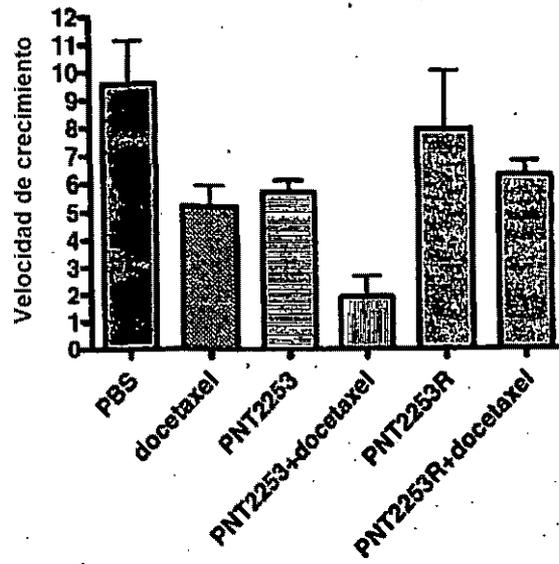


FIGURA 5

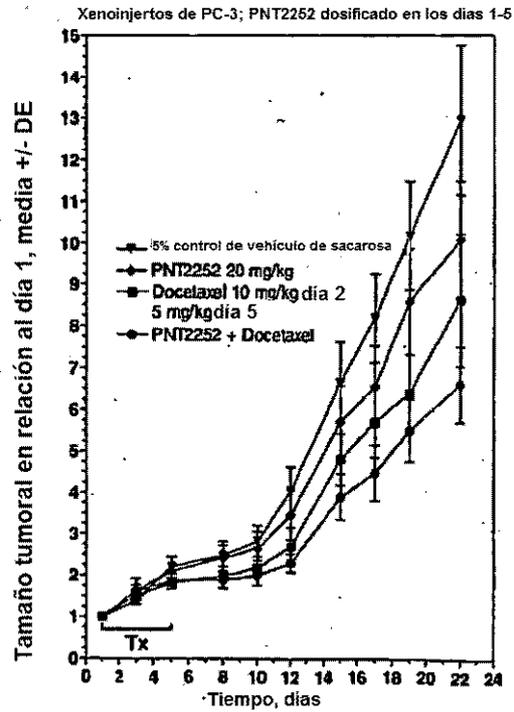
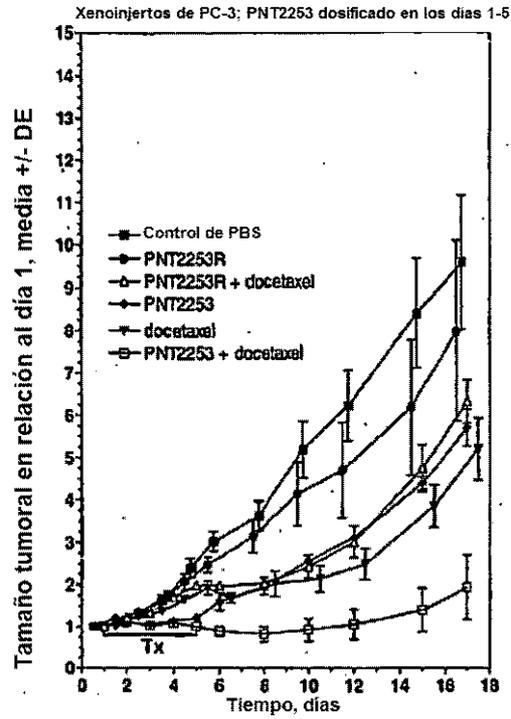


FIGURA 6

FIGURA 7

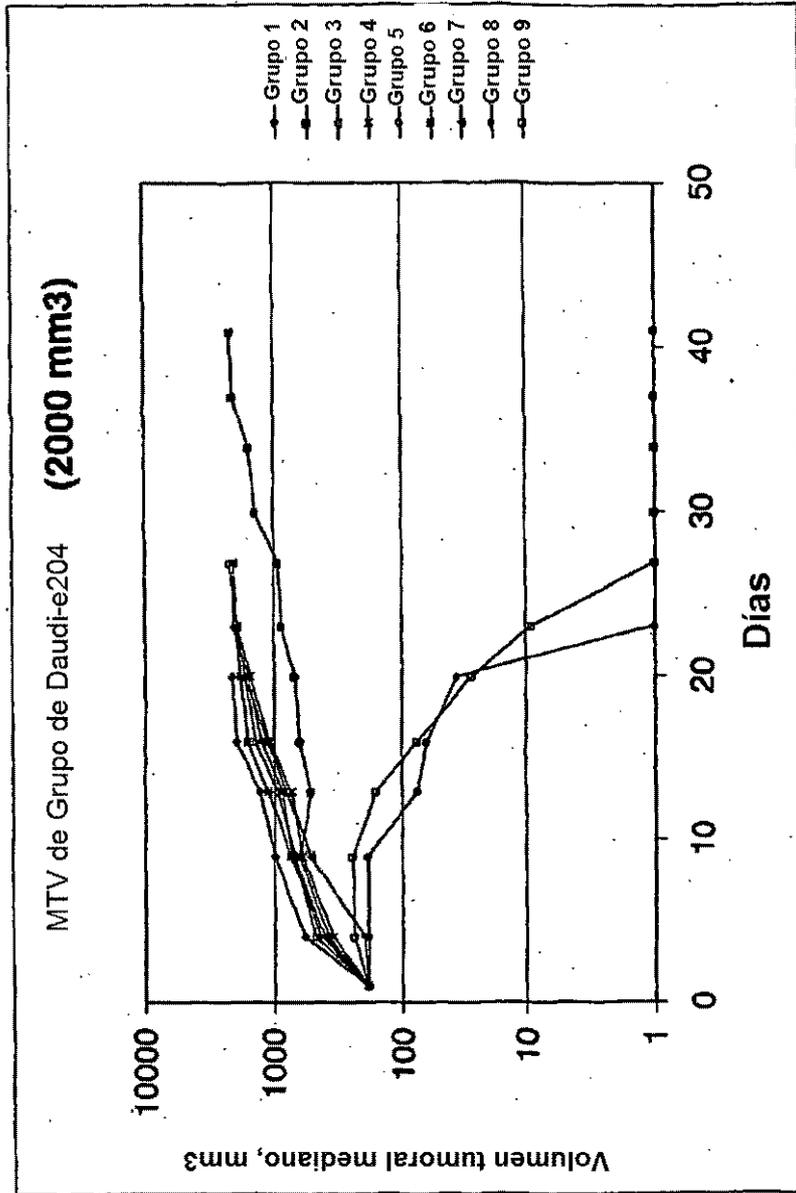


FIGURA 8

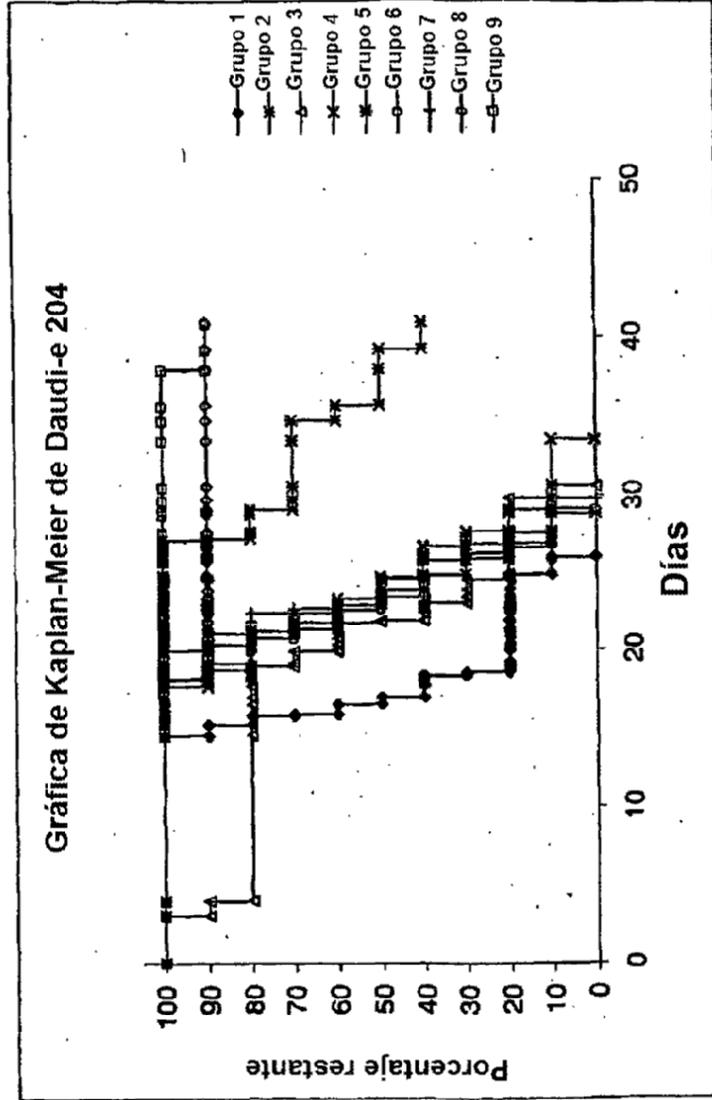


FIGURA 9

