

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 197**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2013 PCT/US2013/036896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158717**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13778964 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2839002**

54 Título: **Composiciones que comprenden una internalización de molécula de ácido nucleico, y sus métodos de uso**

30 Prioridad:

17.04.2012 US 201261625363 P

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

19.02.2018

73 Titular/es:

**UPSTREAM THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
6 Davis Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**AHRENS, DOUG;
BARRY, ASHLEY y
GREENBERG, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 655 197 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).

Composiciones que comprenden una internalización de molécula de ácido nucleico, y sus métodos de uso**Descripción**

5 **[0001]** Esta invención se realizó con apoyo del gobierno bajo el N° de concesión 1R43CA141725-01A1, otorgado por el Instituto Nacional de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0002]** La presente invención se refiere en general al campo de la internalización de las moléculas de ácido nucleico ("iNAS"), y más particularmente a una molécula de ácido nucleico que es capaz de unión e internalización en las células cancerosas de origen de tejido diferente. Los iNAs también son útiles para la administración de agentes terapéuticos o diagnósticos en las células cancerosas, y/o células implicadas en otras enfermedades o trastornos, que expresan una molécula en su superficie celular reconocida por los iNAs de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0003]** El cáncer sigue siendo una causa importante de mortalidad y morbilidad y, por lo tanto, se desean tratamientos contra el cáncer que son más eficaces y con menos efectos secundarios, que las terapias existentes. Actualmente, existe una necesidad no satisfecha de mejorar la focalización de los agentes terapéuticos en el tratamiento de cáncer. Mientras que los agentes citotóxicos potentes han sido (y siguen siendo) desarrollados como agentes contra el cáncer, sin suministro dirigido al medio ambiente del tumor, los agentes citotóxicos se distribuyen por todo el cuerpo (en la administración sistémica) o tejido (en una administración localizada). Como resultado, hay una necesidad de niveles de dosificación más altas para lograr una cantidad terapéuticamente efectiva de agente citotóxico en el sitio del tumor, y la exposición de las células no diana al agente citotóxico que con frecuencia resulta en efectos secundarios no deseados o toxicidades abiertas de limitación de dosis.

20 **[0004]** El cáncer de próstata es la forma más común de cáncer y la segunda causa principal de muerte entre los hombres en los Estados Unidos. El tratamiento del cáncer de próstata se complica por el hecho de que la enfermedad progresa a través de diversas etapas de malignidad, tales como la dependencia de andrógenos, la independencia de andrógenos, y la metástasis. En este sentido, las células de cáncer de próstata pueden variar en su expresión de moléculas de superficie celular a medida que progresan a través de las diversas etapas de malignidad. El suministro dirigido a PSMA que expresa células de cáncer de próstata ("PSMA+") se ha propuesto al utilizar un aptámero que se une a PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata). Mientras que un número de estudios ha demostrado que la expresión de PSMA es un marcador sensible y específico para el adenocarcinoma de próstata, aproximadamente un tercio de adenocarcinoma de próstata carecen de expresión en la superficie de células detectable de PSMA ("PSMA (-)").

30 **[0005]** Orawa E W et al, "Delivering cargoes into cancer cells using DNA aptamers targeting internalized surface portals", *Biochemica et Biophysica Acta - Biomembrances*, vol. 1798, N° 17, 1 de diciembre de 2010, páginas 2190-2200 describe aptámeros sintéticos de cadena simple de ADN largos de 25 bases para la unión a los marcadores tumorales internalizados conocidos, tales como los antígenos CD33, CEA, MUC1 y Tn e importar a través de estos portales de superficie en células cancerígenas. La consecuencia clave de la utilización de aptámeros internalizados es su capacidad para acumularse dentro de las células, encaminando por tanto sus cargas terapéuticas a sitios intracelulares relevantes a su acción. Shigdar S et al, "ARN aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule", *Cancer Science*, vol. 102, N° 5. 14 mayo de 2011, páginas 991-998, describe un aptámero de ARN de 40 bases, truncado a 19 bases, que se une a EpCAM de un oligonucleótido aleatorio que interactúa específicamente con un número de células de cáncer de humanos vivos derivado de mama, los cánceres colorectales, y gástricos que expresan EpCAM. Este aptámero de ARN EpCAM se internaliza eficazmente tras la unión a superficie celular EpCAM.

40 Zhou et al Jiehua "Aptamer-targeted cell-specific ARN interference", *Silence*, vol. 1, N° 1, 1 febrero de 2010, p 4 resume desarrollos recientes utilizando aptámeros de internalización de células para administración de ARNs a las células cancerosas. Esta potente capacidad de ARN(si) de interferencia pequeña para inhibir la expresión de transcritos de ARN complementarios está siendo explotada como una nueva clase de agentes terapéuticos para una variedad de enfermedades. Sin embargo, la prestación eficiente y segura de ARNs en las poblaciones de células específicas sigue siendo el principal reto en el desarrollo clínico de la terapéutica de ARNi.

RESUMEN DE LA INVENCION

50 **[0006]** Se describe en el presente documento una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que se une a las células cancerosas (tales como células de cánceres que se originan a partir de uno o más órganos o tejidos, o líneas celulares establecidas de los mismos), y media la internalización de la molécula de ácido nucleico en una célula que expresa una molécula de superficie celular para la que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión (por lo tanto, la molécula de ácido nucleico se conoce como una "internalización de la molécula de ácido nucleico", abreviada como "iNA"). La composición puede comprender además un conjugado que comprende el iNA vinculado a una molécula que es útil en el tratamiento y/o la detección de células que expresan

una molécula de superficie celular para el que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión.

[0007] Según la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico de internalización ("iNA") modificado para incluir al menos un resto efector, en donde el al menos un resto efector comprende uno o más de un fármaco o resto detectable o combinación de los mismos, en el que el iNA:

- a. comprende ARN que se une a una molécula de superficie celular en las células tumorales y en el que la molécula de superficie celular es distinto de antígeno de membrana específico de la próstata;
- b. es capaz de unión e internalización en más de un tipo de célula tumoral; y
- c. comprende ARN de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos que tienen una estructura de tallo-bucle, según lo predicho por un algoritmo de plegamiento de ARN, en el que la estructura de tallo-bucle comprende al menos dos partes de bucle, en el que al menos dos partes de bucle de la estructura tallo-bucle comprenden una secuencia de ácido nucleico que contiene un motivo de nucleótidos contiguos de UUUCGG; y en el que el iNA modificado se internaliza en las células diana, en la administración de la fracción de al menos un efector en las células diana

para su uso en la administración de al menos un resto efector en las células diana.

[0008] Proporcionado es un iNA que se une específicamente a una molécula de superficie celular expresada diferencialmente por las células cancerosas, en comparación con el tejido sano probado hasta la fecha, para el que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión.

[0009] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico de internalización modificado, en el que la molécula de ácido nucleico de internalización ("iNA"):

- (a) comprende ARN de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos y que tiene una estructura de tallo-bucle que contiene al menos una porción de bucle; donde la porción de al menos un bucle comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene al menos un motivo conservado seleccionado de UUUCGG, UUUCGGGC, o (UUUCGG)_Nm(UUUCGG)_N(SEQ ID NO: 22), o una combinación de los mismos; en la que n es un número de uno a cuatro, N es un nucleótido, m es un número de 0 a 4;
- (b) es capaz de unirse a una molécula de superficie celular en las células tumorales, en la que la molécula de superficie celular es distinta de antígeno de membrana específico de la próstata; y
- (c) se modifica para incluir al menos una modificación química, en la que al menos una modificación se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico de iNA, la incorporación de un nucleótido modificado en el iNA, la conjugación a un enlazador, y la conjugación con al menos un resto efector comprende uno o más de un fármaco o resto detectable o combinación de los mismos; y
- (d) o el iNA modificado es capaz de internalizar en las células tumorales.

[0010] De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico de internalización ("iNA") que comprende ARN de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos y que tiene una estructura de tallo-bucle, según lo predicho por un algoritmo de plegamiento de ARN, en el que la estructura de tallo-bucle comprende al menos dos partes de bucle, en el que cada una de las al menos dos partes de bucle de la estructura de tallo-bucle comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene un motivo de nucleótidos contiguos de UUUCGG.

[0011] Sorprendentemente, como se muestra en el presente documento, estos iNAs se han encontrado para unirse e internalizar en células de cáncer humano representativas de varios tipos de tumores malignos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, leucemia mielógena crónica, linfoma de células B, el glioblastoma multiforme, el carcinoma epidermoide), así como células de cáncer humano de diversas etapas de la enfermedad maligna, pero no de forma detectable a las células humanas de tejido normal (no maligno) ensayado. iNA se puede usar solo, o en forma modificada (por ejemplo, modificarse adicionalmente para comprender al menos una modificación química), en una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, o en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad. iNA puede modificarse adicionalmente para incluir al menos una modificación química, en el que la modificación por lo menos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una sustitución química en una posición de azúcar de uno o más nucleótidos, una sustitución química en una posición de fosfato de uno o más nucleótidos, y una sustitución química en una posición de base de uno o más nucleótidos), la incorporación de un nucleótido modificado, la conjugación a un enlazador, y la conjugación a un resto efector que comprenden drogas, un resto detectable (por ejemplo, una molécula detectable por cualquiera de fluorescencia, luminiscencia, cromogenicidad, la radioactividad, actividad de la enzima) o una combinación de los mismos. iNA o iNA modificado pueden proporcionarse en forma aislada (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias reaccionantes, tales como productos químicos, enzimas y reactivos, usado en la síntesis de iNA o iNA modificado).

[0012] También se describe un método para suministrar específicamente un resto efector a las células cancerosas, que comprende las etapas de poner en contacto las células cancerosas con un iNA que está acoplado a un resto efector (con o sin el uso de un enlazador), en el que el iNA específicamente se une a una porción extracelular o

epítopo de una molécula de superficie celular para el que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, en el que el resto efector se administra a las células cancerosas. La administración a las células comprende internalización de uno o más de (a) iNA acoplado al resto efector, o (b) el resto efector en sí, en las células de cáncer contactadas por el iNA acoplado a un resto efector.

[0013] Una realización de la descripción describe un conjugado de fármaco específico de tumor compuesto por (a) una molécula de ácido nucleico de internalización compuesta de ARN que se une a una molécula de superficie celular para la que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión en las células tumorales, en las que la internalización molécula de ácido nucleico reconoce una molécula de superficie celular distinta de antígeno de membrana específico de la próstata, en el que la molécula de ácido nucleico de internalización es capaz de unión e internalización en más de un tipo de cáncer ("tipo", refiriéndose a origen anatómico o de origen tipo de tejido, por ejemplo, más de uno de: cáncer de mama, cáncer de próstata, el glioblastoma, leucemia, linfoma, carcinoma colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, y el cáncer de colon), al suministrar un agente diana que tiene tanto la especificidad para dirigirse a tumores como la capacidad de internalizar en las células tumorales; (b) un enlazador que se utiliza para acoplar la molécula de ácido nucleico de internalización a un fármaco citotóxico; y (c) una citotoxina, tal como un fármaco que es citotóxico.

[0014] También se describen métodos para la administración de iNA, o composición farmacéutica que comprende el iNA, a las células diana que expresan una molécula de superficie celular para el que la molécula de ácido nucleico tiene la especificidad, en el que las células se desea una modificación de un proceso biológico de unión, tal como en el tratamiento de enfermedades u otras condiciones médicas como el cáncer, las condiciones pre-cancerosas (por ejemplo, inflamación crónica como progenitor para el desarrollo de tumor, metaplasia, hiperplasia, displasia, y pólipos), y la proliferación celular y/o trastornos diferenciadores. El método de tratamiento de una enfermedad con una composición farmacéutica como se describe puede comprender además el uso en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos, de manera que la terapia de combinación actúa para mejorar o amplificar un efecto terapéutico, en comparación con utilizar sin la terapia de combinación. Por lo tanto, se describe un método de suministrar un agente terapéutico a las células diana que expresan una molécula de superficie celular para la que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, el método comprende poner en contacto las células diana con un iNA modificado adicionalmente para incluir al menos una modificación química, en el que la modificación por lo menos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico, incorporación de un nucleótido modificado, la conjugación a un enlazador, y la conjugación a un resto efector que comprende un fármaco, un resto detectable, y una combinación de los mismos. Con la especificidad de unión de iNA para las células diana, el agente terapéutico se suministra a las células diana principalmente, y mínimamente a células distintas de las células diana.

[0015] También se describe un método para suministrar al menos un resto efector en las células diana, comprendiendo el método: poner en contacto las células diana con un iNA modificado para incluir al menos un resto efector, en donde el resto al menos un efector comprende un fármaco, un resto detectable, o una combinación de los mismos; en el que el iNA comprende al menos una estructura de bucle-tallo según lo predicho por un algoritmo de plegamiento de ARN, y además comprende, en al menos una porción de bucle de una estructura de bucle-tallo, una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que contiene al menos un motivo conservado (por ejemplo, UUUCGG; UUUCGGGC; (UUUCGG)_m(UUUCGG)_n (SEQ ID NO: 22), o una combinación de los mismos), en donde n es un número de uno a cuatro, y entre las repeticiones UUUCGG es uno o más nucleótidos N, en el que N puede ser uno cualquiera o más de A, U, C o G, y m es un número de 0 a 4 para indicar el número de bases N; o una combinación de los mismos); y en el que el iNA modificado se internaliza en las células diana en la administración de al menos un resto efector en las células diana.

[0016] También se describe un método para tratar, prevenir y/o mejorar una enfermedad o afección asociada con la expresión de una molécula de superficie celular para la que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, comprendiendo el procedimiento administrar una composición farmacéutica de la invención a un individuo que tiene una enfermedad asociada con la expresión de la molécula de superficie celular para el que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, en donde la composición se administra en una cantidad eficaz para tratar, prevenir y/o mejorar la enfermedad o condición.

[0017] Se describe además un iNA que se une a células que expresan una molécula de superficie celular para el que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, y media la internalización en dichas células; en el que el iNA se puede usar para uno o más de diagnóstico in vitro o en diagnósticos in vivo. Por ejemplo, para su uso en diagnósticos in vivo, iNA puede modificarse químicamente mediante conjugación con un agente quelante metálico para permitir el marcaje con radioisótopos para la detección in vivo mediante técnicas de imagen estándar para radioisótopos. Un método de detección descrito en este documento comprende poner en contacto las células con una composición, que comprende un iNA de la invención químicamente modificado para ser vinculado o acoplado a un resto detectable, y detectar la presencia o ausencia de resto detectable asociado con las células; en el que las células, que se detectan por contener el resto detectable, comprenden células que expresan una molécula de superficie celular para el que el iNA tiene especificidad de unión y con el que media la internalización. El método de diagnóstico puede ser para uso in vivo, o in vitro. Con la especificidad de unión de iNA para las células que expresan una molécula de superficie celular para el que el iNA tiene especificidad de unión y con el que media la

internalización, otras células (que carecen de expresión de dicha molécula de superficie celular) se detectará mínimamente o no se detectará.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

[0018]

FIG. 1A y FIG. 1B son diagramas esquemáticos de la estructura secundaria, tal como se predijo y generados por algoritmos plegables de ARN, que contiene uno o más motivos conservados, que la FIG. 1A es un esquema de la estructura secundaria para iNA de longitud completa (incluyendo regiones fijas 5' y 3') que tiene una región variable que comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO: 19; y la FIG. 1B es una vista esquemática de la estructura secundaria para iNA de longitud completa que tiene una región variable que comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO: 20.

FIG. 2A, FIG. 2B, FIG. 2C, y FIG. 2D son diagramas esquemáticos de la estructura secundaria, tal como se predijo y generados por algoritmos plegados de ARN, que contienen uno o más motivos conservados, que la FIG. 2A es un esquema de la estructura secundaria para un iNA que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 25; FIG. 2B es una estructura secundaria para un iNA que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 26; FIG. 2C es un esquema de la estructura secundaria para un iNA que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 27; y la FIG. 2D es una vista esquemática de la estructura secundaria para iNA que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 28.

FIG. 3 es un esquema de la estructura secundaria para un iNA que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 26; y para los mutantes 1-8 de este tipo que comprende secuencias de nucleótidos iNA de SEQ ID NOs: 29-36, respectivamente.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0019] La invención se refiere a la internalización de moléculas de ácido nucleico ("iNA" que se unen específicamente a células que expresan una molécula de superficie celular para el que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, y que media la internalización en las células. Por lo tanto, iNA (y cualquier modificación de la misma) puede ser internalizado en las células que expresan una molécula de superficie celular para el que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, y más preferiblemente en células de cáncer humano. iNA puede modificarse adicionalmente para incluir al menos una modificación química, en el que al menos una modificación se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico, la incorporación de un nucleótido modificado, la conjugación a un enlazador, y la conjugación a un resto efector que comprende un fármaco, un resto detectable, o una combinación de los mismos. Definiciones - Mientras que se cree que los siguientes términos son bien entendidos por un experto normal en la técnica de la biotecnología, las siguientes definiciones se exponen para facilitar la explicación de la invención.

[0020] El término "aminoácido", como se usa aquí, se refiere a aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales, así como análogos de aminoácidos. aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, mientras que los aminoácidos no naturales están representados por D-aminoácidos (la forma estereoquímica "D" de un aminoácido de origen natural). Los análogos de aminoácidos se refieren a aquellos aminoácidos que tienen básicamente la misma estructura química como un aminoácido natural, excepto tener un grupo R modificado o esqueleto del péptido modificado. Por ejemplo, como se ilustra en el presente documento para un enlazador escindible que comprende al menos dos aminoácidos, uno de tales aminoácidos pueden ser citrulina (un precursor de la arginina).

[0021] Los términos "célula" o "células", como se usa aquí, se refiere a una o más células o tipos de células de origen mamífero, y más deseablemente de origen humano. "Células diana" se refiere a células que expresan, en su superficie celular, una o más moléculas para las que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, en el que sobre las células de unión con el iNA (a través de la molécula de la superficie celular), mediada es la internalización de iNA en las células.

[0022] El término "citotóxico", tal como se utiliza aquí en conexión con una citotoxina, significa matar o detener el crecimiento de las células.

[0023] Los términos "primero" y "segundo" se usan en este documento para efectos de la distinción entre dos moléculas, o entre dos restos, o entre dos posiciones diferentes en una molécula, como será más claro de la descripción.

[0024] Los términos "internalización de molécula de ácido nucleico" o "iNA", se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a una molécula de ácido nucleico: (a) de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, y con frecuencia es de aproximadamente 30 nucleótidos a 65 nucleótidos de longitud; (b) se une a una molécula que se encuentra en la superficie de una célula; y (c) que, después de la unión a la molécula de superficie celular, se internaliza o transporta en una célula. Un iNA puede estar compuesto de ADN, o

65

ARN, o una combinación de los mismos. Un iNA puede comprender una modificación química que comprende la incorporación de una o más bases de ácido nucleico modificadas (por ejemplo, nucleótidos modificados), por ejemplo, para mejorar la farmacocinética y/o la estabilidad (por ejemplo, contra las nucleasas) cuando se administran in vivo. Por ejemplo, purinas modificadas se conocen para incluir, pero no se limitan a, nucleótidos 2'-O-metilo; y se sabe que incluyen pirimidinas modificadas, pero no se limitan a, nucleótidos 2'-desoxi-2'-fluoro o nucleótidos 2'-desoxi-2'-fluoroarabino. Por lo tanto, modificaciones químicas de nucleótidos para iNA pueden incluir, sin limitación, enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos 2'-O-metilo, ribonucleótidos 2'-desoxi-2'-fluoro, ribonucleótidos 4'-tio, nucleótidos 2'-O-trifluorometilo, nucleótidos 2'-O-etilo-trifluorometoxi, nucleótidos difluorometoxi-etoxi 2'-O-, L-nucleótidos, y nucleótidos 5-C-metilo. Con respecto a la presente invención, el iNA se une a una molécula de superficie celular para el que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, con una afinidad representada por una K_D (constante de disociación) de no más de aproximadamente 100 nM, y preferiblemente una K_D no mayor de 75 nM, o una K_D no mayor que 50 nM, o una K_D no mayor que 25 nM, o una K_D no mayor que 10 nM, o una K_D de menos de 10 nM.

[0025] El término "motivo conservado", que se utiliza en el presente documento para los fines de la memoria descriptiva y reivindicaciones, se refiere a una secuencia de nucleótidos: (a) que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 nucleótidos contiguos (véase, por ejemplo, UUUCGG; UUUCGGGC; UUUCGG) N_m (UUUCGG) n (SEQ ID NO: 22), o una combinación de los mismos); (b) que consiste en elementos de secuencias conservadas (por ejemplo, como se determina por el intercambio de ese motivo de las secuencias de más de un iNA que tiene capacidad de unión para la misma molécula de la superficie celular, y que media la internalización en las células); y (c) se observa en un patrón característico de ocurrencia en una posición preferida o región de la porción de unión de la secuencia de nucleótidos iNA, tal como en al menos una porción de bucle de una estructura de tallo-bucle en un iNA que tiene al menos una estructura de tallo-bucle según lo predicho por un algoritmo plegado de ARN. Tener al menos un motivo conservado puede jugar un papel en la formación de una estructura necesaria para la unión a una molécula de superficie celular para la que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión, y a través del cual media la internalización en las células. En este sentido, con la ayuda de motivo disponible en el mercado en busca de software, y el software en el análisis de múltiples clones seleccionados por uno o más métodos de selección para la afinidad a las células cancerosas de unión de ARN plegable, se identificó un motivo conservado, junto con su patrón característico de ocurrencia en la secuencia iNA (véase, por ejemplo, la Tabla 4). Así, en una realización, un iNA de acuerdo con la presente invención comprende uno o más de: (a) una secuencia de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un motivo conservado (por ejemplo, UUUCGG; o UUUCGGGC; o una repetición de (UUUCGG) N_m (UUUCGG) n (SEQ ID NO: 22), en donde n es un número de uno a cuatro, y entre las repeticiones UUUCGG es uno o más nucleótidos N, en donde N puede ser uno cualquiera o más de A, U, C o G, y m es un número de 0 a 4 para indicar el número de bases N; o una combinación de los mismos); y en el que el ácido nucleico se une a, y es internalizado por, células que expresan una molécula de superficie celular a la que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión; o (b) un iNA de 20 a aproximadamente 60 nucleótidos contiguos que tienen sustancialmente la misma capacidad de unirse a, y es internalizado por la célula que expresa la molécula de superficie celular a la que el iNA se une, como un iNA con un motivo conservado de acuerdo con la invención. En otra realización, un iNA puede tener % de identidad de al menos 70% de identidad, 75% de identidad, 80% de identidad, 85% de identidad, 90% de identidad, 95% de identidad, y hasta 99% de identidad con la secuencia de ácido nucleico de un iNA que comprende la secuencias de nucleótidos seleccionados de uno o más de SEQ ID NOs: 25 y 38, o con parte variable de un iNA el que la porción variable comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de una o más de SEQ ID NOs: 19 y 20; siempre que (a) un motivo conservado, que aparece en uno o más bucles de la estructura tallo-bucle del iNA, es UUUCGG, o UUUCGGGC, o (UUUCGG) N_m (UUUCGG) n (SEQ ID NO: 22); y (b) mantenida es al menos una estructura tallo-bucle según lo predicho por un algoritmo de ARN plegado. El término "identidad" en la descripción de secuencias de ácidos nucleicos, se refiere a un porcentaje especificado de nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, y como se mide usando inspección visual o un algoritmo de comparación de secuencias conocido en la técnica, tales como GAP, BESTFIT, FASTA, BLASTN y TFASTA.

[0026] El término "resto detectable", utilizado aquí, se refiere a un resto que tiene una propiedad enzimática, fotoquímica, propiedad detectable física, biológica, eléctrica, óptica, bioquímica, inmunoquímica o química.

[0027] El término "enlazador" se usa aquí para significar una entidad química que conecta dos moléculas juntas (por ejemplo, la conexión de dos moléculas diferentes juntas tal como un iNA con un resto efector tal como una citotoxina, o un resto detectable). El enlazador puede, opcionalmente, comprender además un espaciador autoinmolutivo. Como se ilustra en algunas realizaciones en el presente documento, en el uso de un iNA para administración de un resto efector a células diana, preferiblemente el ligador es escindible mediante un proceso in vivo (por ejemplo, enzimático, reductor, mediado por pH) en un sitio que comprende uno o más de: cerca de las células diana (por ejemplo, las enzimas que se presentan extracelularmente en referencia a las células diana, tales como las producidas en el medio ambiente del tumor cuando las células diana son células cancerosas) o dentro de las células diana (por ejemplo, pH o enzimas encontradas intracelularmente como en los procesos lisosomales/endosomales). Como se describirá en este documento en más detalle, se conocen restos escindibles en un enlazador para incluir, pero no se limitan a, enlaces peptídicos, enlaces de nucleótidos, enlaces disulfuro, enlaces hidrazona y enlaces éster. Los términos "preferente" y "preferentemente" se usan indistintamente en el presente

documento, en relación con la escisión de un resto escindible de un enlazador escindible, en el sentido de que (a) sustancialmente todos o la mayoría del resto escindible del enlazador escindible se escinde en uno o más de (i) el microambiente de las células diana, y (ii) las células diana (es decir, con escisión intracelularmente); y (b) no más de 25%, y típicamente no más de aproximadamente 15%, más típicamente no más de 10%, más preferiblemente no más de aproximadamente 5% o no más de aproximadamente 1%, de la fracción escindible de un enlazador escindible (utilizado como al menos una modificación química de un iNA) se escinde en sangre en la primera hora, o 2 horas, o más, después de la administración del iNA modificado químicamente. La sensibilidad de un resto escindible de un enlazador escindible a la escisión en la sangre se puede determinar usando en ensayos de actividad de escisión in vitro conocidos en la técnica, el uso de sangre o productos de sangre tales como plasma o suero, o enzimas aisladas.

[0028] El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se usa en la presente memoria para significar cualquier compuesto o composición o vehículo medio útil en uno cualquiera o más de administración, entrega, almacenamiento, la estabilidad de una composición o iNA descritos en este documento. Estos portadores son conocidos en la técnica para incluir, pero no se limitan a, agua, solución salina, vehículo adecuado (por ejemplo, liposomas, micropartículas, nanopartículas, emulsión, cápsula), tampón, vehículo parenteral médico, excipiente, solución acuosa, suspensión, disolvente, emulsiones, detergente, agente quelante, agente, diluyente, sal, colorante, polímero, hidrogel, tensioactivo, emulsionante, adyuvante, carga, conservante, estabilizador, aceite, y la solubilización como la manera más amplia conocida en la técnica farmacéutica.

[0029] El término "espaciador autoinmolutivo" se utiliza aquí para referirse a un resto químico bifuncional que es capaz de acoplar covalentemente un primer resto químico con un segundo resto químico en una molécula tripartita estable. Tras la escisión del enlace a la primera porción química de la molécula tripartita, el espaciador autoinmolutivo es capaz de separarse espontáneamente del segundo resto químico.

[0030] El término "grupo reactivo" se usa aquí para significar un grupo químico que es capaz de hacerse reaccionar con otro grupo químico en la formación de un enlace. Por ejemplo, un grupo reactivo de aminoácido, para unir un enlazador peptídico a un resto efector que comprende una citotoxina o resto detectable, o a un uso de química de fijación iNA conocido en la técnica, puede incluir, pero no está limitado a una amina, carboxilo, sulfhidrilo, o un grupo hidroxilo. En otro ejemplo, un grupo reactivo de un nucleótido, en la fijación de un iNA a cualquiera de un enlazador, o resto efector usando química de fijación conocida en la técnica, puede incluir pero no está limitado a un grupo reactivo en una base (por ejemplo, una amina exocíclica) o un grupo hidroxilo en un resto de azúcar. Por ejemplo, para el acoplamiento de un grupo reactivo de una primera molécula a una segunda molécula en la formación de una composición de acuerdo con la invención, en el que la primera molécula tiene un grupo amino libre que puede hacerse reaccionar con un grupo amina reactivo, tales grupos de amina reactiva pueden incluir, sin limitación, un grupo éster de succinimidilo, un grupo éster de sulfosuccinimidilo, un grupo éster de tetrafluorofenilo, un grupo carbonilo azida, un grupo isocianato, un grupo cloruro de sulfonilo o un grupo que contiene aldehído. En otro ejemplo, para el acoplamiento de un grupo reactivo de una primera molécula a una segunda molécula en la formación de una composición de acuerdo con la invención, en el que la primera molécula tiene un grupo tiol libre (también llamado sulfhidrilo) que puede hacerse reaccionar con un grupo reactivo con tiol, tales grupos reactivos con tiol pueden incluir, sin limitación, un grupo maleimida, un grupo yodoacetamida, un grupo de fenilmercurio, un grupo tiosulfato o un grupo bromuro de metilo. Por ejemplo, para el acoplamiento de un grupo reactivo de una primera molécula a una segunda molécula en la formación de una composición de acuerdo con la invención, en el que la primera molécula tiene un grupo carboxilo libre que se puede hacer reaccionar con un grupo carboxilo reactivo, tales grupos reactivos carboxilo pueden incluir, sin limitación, un grupo hidrazida, un grupo hidroxilamina, un grupo cadaverina o un grupo amina. El aminoácido o nucleótido o enlazador o resto detectable se pueden modificar adicionalmente en uno o más sitios para permitir la unión de un grupo reactivo deseado en la molécula (un ejemplo no limitativo de modificar el extremo 5' de un iNA con un tiofosfato), o puede ser modificado y conectado, mediante un resto reticulante, incluyendo, sin limitación, un agente de reticulación homobifuncional (por ejemplo, incluyendo, sin limitación, bis(maleimido)hexano o BMH; o DSP o reactivo de Lomant, con enlace disulfuro escindible en el enlazador), o un agente de reticulación heterobifuncional (incluyendo, sin limitación, succinimidilo-6-[(β-maleimido-propionamido)hexanoato], SMPH, o N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)-propionato, SPDP, con enlace de disulfuro escindible en un enlazador). Succinimidilo-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) es un reticulante heterobifuncional no escindible y permeable a membrana que contiene un N-hidroxisuccinimida reactiva a amina (éster NHS) y un grupo de maleimida reactiva con sulfhidrilo.

[0031] Presentada en este documento es una descripción más detallada de la invención. Ciertos aspectos de la invención se describen en mayor detalle en los ejemplos no limitativos que siguen.

iNA

[0032] De acuerdo con un un aspecto de la invención, se proporciona un iNA que se une específicamente a una molécula de la superficie celular, tal como en ciertas células humanas, como se describe en más detalle en este documento. Sorprendentemente, como se muestra en el presente documento, se ha encontrado que iNAs de la invención se unen e internalizan en las células de cáncer humano representativas de varios tipos de tumores malignos, así como a células de cáncer humano de diversas etapas de la enfermedad maligna, pero no de forma

detectable a las células humanas de tejido normal (no maligno) ensayado. iNA se puede usar solo, o en forma modificada. iNA puede modificarse adicionalmente para incluir al menos una modificación química, en la que la modificación al menos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico, la incorporación de un nucleótido modificado, la conjugación a un enlazador, y la conjugación con un resto efector que comprende un fármaco, un resto detectable, o una combinación de los mismos. Cuando un iNA de la invención se modifica por conjugación a un resto efector, con o sin el uso de un enlazador entre el iNA y el resto efector, iNA no se modifica con un liposoma que contiene el resto efector; y por lo tanto, evitar una disminución en la especificidad de un liposoma que contiene el conjugado para las células diana pretendidas causadas por interacciones de los liposomas con moléculas de la superficie celular en células distintas de las células diana. En un aspecto, una modificación química que comprende la conjugación implica la formación del enlace covalente, y no a través de asociación no covalente, excepto descrito como de otra manera en el presente documento (por ejemplo, en cuanto a esta última, la conjugación puede ser alternativamente por apareamiento de bases cuando un enlazador a base de ácido nucleico está acoplado por pelado de base a un iNA a través de hibridización). iNAs que tienen afinidad de unión y especificidad para, y que son capaces de internalizarse por una célula diana, y cuyo iNA puede, opcionalmente, ser modificado adicionalmente, se describen en el presente documento (véase Tablas 4 y 5, el Ejemplo 1). En una realización, un iNA de la invención comprende una molécula de ARN de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 65 nucleótidos, mientras que se mantiene la capacidad de unirse e internalizarse en las células diana, en las que la molécula de ARN comprende al menos una estructura de bucle-tallo en que al menos una parte de bucle de al menos una estructura de tallo-bucle comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de uno o más de UUUCGG, UUUCGGGC, (UUUCGG)_N(UUUCGG)_n (SEQ ID NO: 22), en la que n es un número de uno a cuatro, y en el que entre las repeticiones de UUUCGG (véase, por ejemplo, SEQ IF NO: 22) es uno o más nucleótidos N, en donde N puede ser uno cualquiera o más de A, U, C, o G, y m es un número de 0 a 4 para indicar el número de bases N.

[0033] Tal como es conocido para un experto en la técnica, una estructura de tallo-bucle significa una estructura secundaria o tridimensional que comprende al menos una porción de tallo que tiene una forma de tipo tall formada por dos regiones de la misma molécula de ácido nucleico cuya complementariedad se une (por ejemplo, el apareamiento de base intramolecular); y al menos una porción de bucle, por lo general se extiende desde una porción de tallo. Una porción de bucle es principalmente una región monocatenaria de la molécula de ácido nucleico que está desapareada (por ejemplo, carece de apareamiento de base intramolecular) pero también puede incluir una base emparejada única contigua de un tallo en cada extremo del bucle, en la formación de una forma de bucle tal como se predijo por los algoritmos plegables de ARN. En otro aspecto de la invención, proporcionado es un iNA que se une a, y se internaliza en las células diana, en el que el iNA comprende al menos una estructura de tallo-bucle en el que al menos una parte de bucle de al menos una estructura de tallo-bucle comprende un motivo seleccionado del grupo que consiste en UUUCGG, UUUCGGGC, (UUUCGG)_N(UUUCGG)_n (SEQ ID NO: 22), en donde n es un número de uno a cuatro, y entre repeticiones de UUUCGG es uno o más nucleótidos N, en donde N puede ser uno cualquiera o más de A, U, C o G, y m es un número de 0 a 4 para indicar el número de bases N, y una combinación de los mismos. Un iNA se puede sintetizar por cualquier método conocido para los expertos en la técnica para la síntesis de ácido nucleico, incluyendo pero no limitado a, la síntesis química (por ejemplo, la síntesis lineal, la síntesis de fragmento (síntesis de porciones) seguido de ensamblaje de los fragmentos a la molécula deseada completa de ácido nucleico, o una combinación de los mismos), la síntesis enzimática (por ejemplo, la extensión del cebador o de la transcripción usando una polimerasa), la escisión de un precursor más grande, la síntesis recombinante, o una combinación de los mismos.

[0034] Dos variaciones del método de selección básico se utilizaron en paralelo para generar una especificidad de unión que tiene iNA para, y media la internalización en células diana. Cada método utilizado en el cribado in vitro de bibliotecas moleculares combinatorias complejas a base de ácido nucleico (por ejemplo, >10¹⁴ secuencias por biblioteca) que emplean un método de selección para moléculas de ácido nucleico de internalización de células (véase, por ejemplo, solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2009/0170711, con licencia para el cesionario de la presente invención). Ambos procesos de selección fueron dirigidos a la generación de un iNA que internaliza en células de cáncer de próstata sólo (por ejemplo, líneas celulares, o las células tumorales primarias). Por lo tanto, fue sorprendente que se generó un iNA que se unió y se internalizó en células de cáncer humano representativas de varios tipos de tumores malignos (por ejemplo, además de las células de cáncer de próstata), así como a células de cáncer humano de diversas etapas de malignidad. En ambos procesos, empleada fue una biblioteca aleatoria de moléculas de ARN, con las moléculas de ARN que comprenden secuencias fijas en el terminal 3' y terminal 5' de la molécula de ARN que flanquean una región interna que comprende los nucleótidos en una secuencia al azar. Mientras que el número puede variar entre bibliotecas, típicamente cada secuencia fija comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos contiguos, y la región interna comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos. La biblioteca de oligonucleótidos puede sintetizarse usando cualquier método estándar en la técnica para la síntesis de molécula de ácido nucleico, incluyendo, pero no limitado a la síntesis química en un sintetizador de molécula de ácido nucleico automatizado.

[0035] En el método de selección, la biblioteca de partida de oligonucleótidos se puso en contacto y se incubaron con una línea celular de cáncer de próstata. Después, las células se lavaron, y se trataron con una nucleasa para eliminar los oligonucleótidos que se unen a la parte exterior de las células. En este caso, una mezcla de RNAsas como utilizado para digerir los oligonucleótidos de la biblioteca de partida que no se habían internalizado en las

células. Las células se lavaron de nuevo, y se extrajo el ARN total de las células tratadas. El ARN total extraído entonces se transcribió de forma inversa, usando cebadores específicos para las secuencias fijas, en el ADN. Se utilizaron estas plantillas de ADN para crear un grupo enriquecido de moléculas de ARN, a través de la transcripción in vitro, para la siguiente ronda de selección. Preferiblemente, se usó un mutante de ARN polimerasa de T7 en la transcripción que permitió la incorporación de nucleótidos modificados (por ejemplo, pirimidinas modificadas por 2'fluoro) para mejorar la estabilidad de la combinación enriquecida de moléculas de ARN en cada ronda de selección (por ejemplo, a partir de nucleasas que pueden presentarse en el cultivo celular). Múltiples rondas de selección se repiten. En la variación del método de selección utilizado, se utilizó la misma línea celular de cáncer de próstata (por ejemplo, células PC-3) durante todo el proceso de selección. En la otra variante del método de selección utilizado, en la repetición de las múltiples rondas de selección, se utilizaron diferentes líneas celulares de cáncer de próstata para diferentes rondas. Este tipo de selección se llama una selección "de palanca". Después de varias rondas de selección, el depósito de moléculas de ARN se puede analizar para la capacidad de internalizar en las células, utilizando métodos conocidos en la técnica adecuados para este propósito, incluyendo pero no limitado a PCR cuantitativa y citometría de flujo. El depósito de moléculas de ARN de una ronda de selección también se puede secuenciar para determinar la diversidad restante o convergencia después de una ronda de selección. Los clones individuales de interés pueden entonces ser sintetizados y caracterizados además por propiedades que incluyen, pero no se limitan a la afinidad de unión, especificidad de unión, y la capacidad de internalización. Los clones de interés particular pueden entonces modificarse adicionalmente para ser utilizados en la presente invención como un iNA.

[0036] Un iNA de acuerdo con la invención se puede modificar adicionalmente para incluir al menos una modificación química para modular una o más de la farmacocinética y la biodistribución del iNA modificado. Por ejemplo, el iNA puede modificarse adicionalmente para mejorar la estabilidad in vivo, incluyendo pero no limitado a la resistencia a las nucleasas presentes en los fluidos corporales. Tales modificaciones son conocidas en la técnica para incluir una o más de la limitación de un extremo libre de la molécula de ácido nucleico a ser exonucleasa resistente; la modificación de los enlaces internucleótidos (por ejemplo, modificaciones de fosforotioato o fosfato de alquilo); modificando nucleótidos a ser incorporados en la secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, modificaciones de azúcar de posición 2' para las purinas y/o pirimidinas tales como O-alquilo, O-alilo, O-metilo, o un grupo halo; modificaciones de pirimidina en posición 5'; modificaciones de purina de posición 8'); y modificaciones en aminas exocíclicas. En un ejemplo, un iNA puede modificarse adicionalmente para comprender al menos 25% o 50% o más de los nucleótidos en su secuencia por tener una modificación del azúcar 2', tales como la incorporación de nucleótido modificado (por ejemplo, modificación de azúcar 2' de cualquiera de los nucleótidos de pirimidina puede comprender una modificación 2'fluoro, y/o una modificación de azúcar 2' de cualquiera de los nucleótidos de purina puede comprender una modificación 2'metoxi). En otro ejemplo, un enlazador también puede ser utilizado como una modificación de un iNA de la invención con el objetivo de modular una o más de las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución del iNA. Para ilustrar una tal realización, el número y tamaño de moléculas de glicol de poli-etileno (PEG) utilizadas para modificar el iNA puede variar, dependiendo del tiempo de residencia deseado en la circulación sistémica o tejido después de la administración del iNA modificado, o una composición que contiene el mismo, para el tratamiento de una enfermedad.

[0037] Un iNA de acuerdo con la invención se puede modificar adicionalmente para incluir al menos una modificación química para facilitar la conjugación a un resto efector o enlazador. Tales modificaciones son conocidas para incluir, pero no se limitan a, la incorporación de grupos reactivos o bien durante la síntesis (por ejemplo, síntesis en fase sólida directa) o por modificación post-síntesis. Por ejemplo, durante la síntesis, uno o más nucleótidos modificados pueden incorporarse en iNA en una posición deseada, tal como un nucleótido que contiene alilo. En otro ejemplo, una amina libre se introduce en el extremo 5' o extremo 3' del iNA mediante la incorporación de una fosforamida modificadora de amino en el punto apropiado en la síntesis en fase sólida. Un grupo reactivo puede ser incorporado después de la síntesis tal como por un proceso que incluye, pero no limitado a, la modificación o bien el extremo 5' o extremo 3' de un iNA. Por ejemplo, el extremo 5' puede ser modificado para incluir un tiofosfato (tal como mediante el uso del derivado de reactivo H-fosfonato de 1-dimetoxitritilo 2,2'-ditiodietanol). Además, los grupos de ácido carboxílico se pueden añadir a un iNA en un proceso post-sintético usando métodos conocidos en la técnica.

Drogas

[0038] Un iNA de la invención puede modificarse adicionalmente para incluir al menos una modificación química que comprende la conjugación a un resto efector que comprende un fármaco. El tipo de fármaco puede variar dependiendo de la célula diana, y la enfermedad a tratar. El fármaco también puede comprender un resto detectable (comúnmente denominado un "teranóstico"); por ejemplo, que tienen actividad farmacológica, así como propiedades detectables. Por ejemplo, algunos medicamentos tienen, o pueden ser modificados para tener, propiedades fluorescentes que se pueden utilizar en la detección de la droga una vez dentro de las células diana. Tales ejemplos incluyen pero no se limitan a la doxorrubicina, y los péptidos citotóxicos tienen uno o más residuos de triptófano. En una realización preferida, el fármaco es un fármaco citotóxico, y la célula diana es una célula de células o cáncer precanceroso. En esta realización preferida, los fármacos preferidos para su uso con el iNA son fármacos citotóxicos (citotoxinas), particularmente útiles para tratar el cáncer, o condiciones precancerosas. En este sentido, una citotoxina preferida puede ser utilizada para modificar un iNA de la invención a la exclusión de citotoxina distinta de

la citotoxina preferida. Como se describirá en este documento en más detalle, la conjugación de forma deseable de un iNA a un fármaco es a través de un resto escindible tal como un enlace escindible (si conjuga directamente a iNA) o enlazador escindible (si el iNA está conjugado con el fármaco mediante un enlazador), en el que la escisión se produce preferentemente en el entorno del tumor (por ejemplo, cerca del tumor con el fin de exponer el tumor a la droga, y/o dentro de las células tumorales (intracelularmente), a fin de liberar el fármaco farmacológicamente activo a partir de iNA. Por ejemplo, la liberación del fármaco cerca del tumor puede ser especialmente deseable en ciertas circunstancias, tales como para tratar el tumor y/o angiogénesis tumoral. Las categorías generales de fármacos citotóxicos incluyen, pero no se limitan a agentes que dañan el ADN e inhibidores de enzimas. Se conoce que agentes deteriorantes del ADN incluyen, pero no se limitan a agentes de escisión de ADN; inhibidores de la topoisomerasa (incluyendo pero no limitado a irinotecan, topotecan, camptotecina, lamellarina D, etopósido, tenipósido, ácido aurintricarboxílico, HU-331, y polifenoles de planta (por ejemplo, el EGCG de los polifenoles del té, genisteína, quercetina, resveratrol)); inhibidores de microtúbulos o de tubulina ((incluyendo pero no limitado a vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, dolostatinas (por ejemplo, auristatina E y derivados como monometilo auristatina E), colchicina, análogos de taxano (por ejemplo, las epotilonas A, B y D), maitansinoides, critoficinas, y indibulina); y agentes intercalantes de ADN (incluyendo pero no limitado a la doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, y dactinomicina). Los inhibidores enzimáticos incluyen inhibidores de reductasa de dihidrofolato (incluyendo pero no limitado al metotrexato, y pemetrexado), inhibidores de topoisomerasa, e inhibidores de sintasa de timidilato (incluyendo pero no limitado a raltitrexado, pemetrexado, nolatrexado, ZD9331, y GS7904L).

[0039] Algunas citotoxinas, útiles para modificar iNA de la presente invención, pueden tener un primer grupo reactivo que puede facilitar el acoplamiento a un grupo reactivo presente en un iNA (si acoplado directamente) o en un enlazador, mientras que otras citotoxinas pueden necesitar modificarse primero a sí mismos con un grupo reactivo para facilitar tal acoplamiento. Por ejemplo, citotoxinas representativas que contienen un grupo reactivo que comprende un grupo carboxilo incluyen, pero no se limitan a campotecina, metotrexato, y derivados de los mismos. Si bien hay varios métodos estándar de acoplamiento de un grupo carboxilo y grupo reactivo carboxilo, en una realización ilustrativa 1-etilo-3-[3-dimetilaminopropilo] carbodiimida hidrocloreuro (EDC) se usa frecuentemente para grupos carboxilo para aminas primarias. Además, en presencia de N-hidroxisulfo-succinimida (sulfo-NHS), EDC se puede utilizar para convertir los grupos carboxilo a ésteres de sulfo-NHS amino-reactivos. Citotoxinas representativas que comprenden un grupo sulfhidrilo incluyen, pero no se limitan a esperamicina y sus derivados. Si bien hay varios métodos estándar de acoplamiento de un grupo sulfhidrilo y un grupo sulfhidrilo reactivo, en una realización ilustrativa, dos grupos sulfhidrilo se pueden hacer reaccionar para formar un enlace disulfuro. También, un grupo maleimido se puede usar para conjugar a un grupo tiol. Citotoxinas representativas que comprenden un grupo amina incluyen, pero no se limitan a citabarina, mitomicinas, doxorubicina, daunorubicina, y sus derivados. Si bien hay varios métodos estándar de acoplamiento de un grupo amina y el grupo reactivo con amina, en una realización ilustrativa, un ácido carboxílico se convierte en un éster reactivo con amina (éster de N-hidroxisuccinimida (NHS)) para formar un enlace amida. Una reacción de carbodiimida se puede usar para enlazar un grupo carboxi o amino en un medicamento a un grupo carboxi o amino en un enlazador o iNA. Citotoxinas representativas que comprenden un grupo alcohol incluyen, pero no se limitan a campotecina, taxol y análogos de taxol, esperamicina, vincristina, vinblastina, y sus derivados. También, como se describe aquí con más detalle, un enlazador heterobifuncional se puede utilizar para acoplar un primer grupo reactivo (por ejemplo, presente en la citotoxina) a un segundo grupo reactivo (por ejemplo, presente en el iNA), cuando un iNA comprende además al menos una modificación química.

[0040] Los ejemplos adicionales de citotoxinas útiles con un iNA de la invención incluyen, pero no se limitan, a lo siguiente. Elipticina y sus derivados (por ejemplo, 9-hidroxielipticina, o 6-(-elipticina 3-aminopropilo)) son potentes citotoxinas que pueden ser acopladas a través de nitrógeno 2' a un aminoácido, tal como una cadena lateral de un conector peptídico. Maitansina y ansamitocina P-3 pueden usarse ellos mismos como citotoxinas, o se pueden utilizar como precursores para sintetizar maitansinoides (por ejemplo, maitansinoles; N(2')-desacetilo-N(2')-(3-mercaptopropilo)-maitansina (DM1)) utilizando métodos conocidos en la técnica. Los maitansinoides pueden ser generados que tienen un grupo tiol que puede ser usado para acoplar el fármaco a un enlazador o iNA a través de la formación de unión de disulfuro. Maitansinol se puede convertir en una forma de amina reactiva para reaccionar con un disulfuro que contiene ácido carboxílico en una reacción de carbodiimida. Caliqueamicinas y derivados (por ejemplo, N-acetilo gamma caliqueamicina dimetilo hidrazida) son potentes agentes citotóxicos, y se pueden conjugar a través de una hidrazona sensible a los ácidos a un enlazador o iNA. El grupo hidrazida reactivo reacciona fácilmente con aldehídos para formar una hidrazona, o se puede convertir en una forma reactiva de amina con NHS para el acoplamiento a un enlazador que contiene amina o iNA que contiene amina. Estreptonigrina es un antibiótico antitumoral de aminoquinona que puede ser conjugado a través de uno de sus grupos reactivos, tales como amina o hidroxilo. Además de auristatina, dolastatinas (10 y 15) y sus derivados (por ejemplo, sintadotina, soblidotina, cemadotina), otras citotoxinas de péptidos incluyen, pero no se limitan a tubulinas, exotoxina A de pseudomonas (o fragmentos tóxicos de las mismas, tales como PE38 se componen de aminoácidos 253-364 y 381-613 de exotoxina A de pseudomonas; y HA22-LR, que contiene 11 residuos de dominio II y dominio III, véase, por ejemplo, solicitud de patente publicada de Estados Unidos N° 20100215656), criptoficinas, HTI-286, y péptidos cíclicos y depsipéptidos (por ejemplo, didemnina B, Kahalalido F, deshidrodidemnina B, DMMC, vitilevuamida, diazonimida, tiocoralina); cuyas citotoxinas de péptidos son susceptibles de síntesis química y conjugación usando químicas de péptidos estándar. Los radioisótopos que pueden usarse como restos citotóxicos incluyen pero no están limitados al yodo-131, itrio-90, renio-188, bismuto-212, indio-111, lutecio-177, astato-211, actinio-225, y cobre-67.

Enlazadores

[0041] Un iNA de la invención puede modificarse adicionalmente para incluir al menos una modificación química que comprende la conjugación a un enlazador. El enlazador puede comprender un enlazador escindible o un enlazador no escindible, en función del uso previsto. Por ejemplo, si un iNA se modifica adicionalmente para incluir al menos una modificación química que comprende la conjugación a un resto efector que comprende un resto detectable o un medicamento que comprende un radioisótopo a través de un enlazador, puede ser deseable que el enlazador carezca de un sitio de escisión ("enlazador no escindible"). En un ejemplo donde un iNA se modifica adicionalmente para incluir al menos una modificación química que comprende la conjugación a un resto efector a través de un enlazador en el que la actividad del fármaco o resto detectable es óptimo cuando liberado del iNA (en comparación con la actividad cuando se conjuga con un iNA a través de un enlazador), puede ser deseable que el enlazador comprenda un sitio de escisión ("enlazador escindible"), tal que el fármaco farmacológicamente activo o resto detectable se libera del iNA para realizarse en las células diana. Conectores escindibles comprenden uno o más restos funcionales que pueden ser escindidos preferentemente en una localización deseada, como por ejemplo cerca o en las células diana. En el ejemplo en el que las células diana son células tumorales, el enlazador escindible se escinde preferentemente por vía intratumoral (por ejemplo, uno o más de: en el microambiente del tumor, y dentro de las células tumorales). Como se describirá en este documento en más detalle, ejemplos ilustrativos de tales enlazadores escindibles incluyen, pero no se limitan a uno o más de: radicales (i) de hidrazona que son estables a pH fisiológico y se escinden a pH bajo (tal como un pH encontrado en lisosomas y endosomas), (ii) restos de enlazadores de benzoico-imina que son estables a pH fisiológico y se escinden a un pH bajo (tal como un pH en el intervalo de pH 4,5-5,5 encontrado en los lisosomas y endosomas), (iii) una secuencia peptídica reconocida y escindida por proteasa lisosomal/endosomal (por ejemplo, catepsina B, furina, o una combinación de los mismos), (iv) una secuencia de péptido reconocido y escindido por proteína-alfa de activación de fibroblastos de proteasa de serina unida a la membrana sobreexpresada en la superficie de los fibroblastos del estroma tumoral, pero no se expresa por los fibroblastos u otros tipos de células en los tejidos normales (no cancerosas), y (v) una secuencia de ADN de doble cadena que está preferentemente escindida por la ADNasa II (una nucleasa de pH ácido contenida en los endosomas y lisosomas) en comparación con ADNasa I (contenida en plasma). Por lo tanto, un iNA que comprende al menos una modificación química que comprende la conjugación a un enlazador escindible que comprende uno o más de un resto de hidrazona o una secuencia de péptido escindido por la catepsina B, en el que el enlazador escindible también está conjugado a un fármaco, se puede usar para preferentemente liberar un fármaco una vez internalizado en una o más de lisosomas y endosomas de células diana que se unen e internalizan el iNA químicamente modificado, en comparación con la liberación en el torrente sanguíneo, reduciendo de este modo efectos fuera de diana de la droga. Se ha informado de que en el microambiente de algunos tumores humanos (por ejemplo, cáncer de mama), las células inmunes tales como monocitos son estimulados por el tumor para secretar pequeñas cantidades de catepsina B en un proceso de promover el crecimiento tumoral, invasión y metástasis. Del mismo modo, la mayoría de los tumores epiteliales estimulan los fibroblastos estromales tumorales para producir proteína-alfa de activación de fibroblastos de proteasa de serina unida a la membrana ("FAP"). Por lo tanto, en tales microambientes tumorales, puede ser posible que antes de la internalización cuando se une a un iNA, un enlazador escindido por la catepsina B o por proteína-alfa de activación de fibroblastos de proteasa de serina unida a membrana puede liberar el fármaco por vía intratumoral. La liberación de fármaco por vía intratumoral puede tratar el cáncer por uno o más mecanismos que incluyen el tratamiento directo de las células tumorales, o el tratamiento de tipos de células distintos de tumor que están presentes en el microambiente tumoral y que apoyan o promueven el desarrollo tumoral (uno o más de crecimiento tumoral, invasión, y metástasis).

[0042] Un enlazador a base de ácido nucleico, tal como que comprende una secuencia de ácido nucleico que está preferentemente escindido por la ADNasa II en comparación con ADNasa I, ventajosamente se puede sintetizar con el iNA en el mismo proceso sintético, en la modificación química del iNA, tales como por un sintetizador de ácido nucleico. Alternativamente, el enlazador de ácido nucleico se sintetiza con una extensión de oligonucleótido (por ejemplo, que van desde aproximadamente 5 a aproximadamente 15 oligonucleótidos) que es complementaria a una extensión de oligonucleótido que se sintetizó sobre cualquier extremo 3' o extremo 5' de un iNA de la invención. Las extensiones de oligonucleótidos complementarios se hibridan juntos en la conjugación del enlazador al iNA, en la modificación química del iNA con un enlazador. Tal hibridación puede conseguirse usando condiciones estándar para la hibridación, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, el enlazador a base de ácido nucleico con una tal extensión de oligonucleótido se mezcla con el iNA que comprende una extensión de oligonucleótido que es complementaria a la del enlazador en una proporción de dos veces el volumen molar del iNA con el enlazador en un tampón que contiene 50 mM de MgCl₂. La mezcla se calienta a 55°C durante 10 minutos para desnaturalizar ambas extensiones de oligonucleótidos y para permitir el recocido, y después se enfría a 37°C durante 5 minutos en la hibridación de las secuencias de extensión de oligonucleótidos complementarios, y en la conjugación del enlazador al iNA. Las extensiones de oligonucleótido pueden sintetizarse para incorporar nucleótidos modificados conocidos en la técnica por ser resistentes a las nucleasas; o pueden ellos mismos comprender una secuencia que está preferentemente escindida por la ADNasa II.

[0043] Los ejemplos ilustrativos de los enlazadores escindibles que pueden ser útiles para modificar químicamente un iNA de acuerdo con la invención pueden incluir pero no están limitados a enlazadores que comprenden las secuencias de aminoácidos o secuencias de ADN que figuran en la Tabla 1 (los códigos de una sola letra, a menos que se indique lo contrario).

Tabla 1.

	Secuencia de péptido	enzima/condición para escisión preferencial	SEQ I D NO:
5	GPPGP	FAP	1
	GEAGP	FAP	2
	GETGP	FAP	3
10	GESGP	FAP	4
	GDTGP	FAP	5
	GDSGP	FAP	6
	PPGP	FAP	7
15	DP	ácido-labil en endosomas/lisosomas	
	valina-citrulina	catepsina B	
	fenilalanina-citrulina	catepsina B	
	GFLG	catepsina B	8
20	FK	catepsina B	
	FFK	catepsina B	
	GFK	catepsina B	
	AK	catepsina B	
25	VK	catepsina B	
	GFQGVQFAGF	catepsina B	9
	GFGSVQFAGF	catepsina B	10
	ALAL	catepsina B	11
30	RVRR	catepsina B y furina	12
	AGNRVRRSVG	Furina	13
	TRHRQPRGWEQL	Furina	14
35	SNSRKKRSTSAGP	Furina	15
	secuencia de ácido nucleico		
	(AGAGGA) _n ADNds (TTCCT) n= un número de 1 a 5	ADNasa II	16
40	enlazador químico		
	benzoico-imina	$\begin{array}{c} \text{-C=N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	
45	hidrazona	R1R2C=NNH ₂	

[0044] Un enlazador escindible, utilizado como al menos una modificación química de un iNA para modificar un iNA con un resto efector que comprende un fármaco, resto detectable, o combinación de los mismos, opcionalmente puede comprender además un espaciador autoinmolativo que, cuando está presente, espacia y enlaza entre ellos covalentemente el enlazador y el fármaco. El espaciador autoinmolativo, cuando está presente, está ligado de forma covalente a uno de sus extremos al enlazador (mediante la unión entre un grupo reactivo del espaciador inmolativo sí mismo y un grupo reactivo sobre el enlazador), y unido covalentemente en su otro extremo al resto efector (por la unión entre un grupo reactivo del espaciador autoinmolativo y un grupo reactivo sobre el resto efector). Esta disposición entre el enlazador, el espaciador y el fármaco es típicamente estable hasta que la escisión del enlazador escindible activa la propiedad autoinmolativa del espaciador autoinmolativo de modo que se descompone espontáneamente o es de otra manera escindido o liberado del resto efector sin la necesidad de una hidrólisis separada adicional o etapa enzimática. En una realización en la que el resto efector comprende un fármaco, el fármaco se libera entonces del enlazador en su forma farmacológicamente activa. El espaciador autoinmolativo puede comprender un grupo de aminobencilo modificado tal como un grupo aminobencilo éter, éter de para-aminobencilo, alcohol para-aminobencilo, para-aminobencilo-carbamoilo, o aminobencilacetales de orto o para; un grupo benciloxi-carbonilo para-sustituido; un grupo 2-aminoimidazol-5-metanol; amidas de ácido 4-aminobutírico o ácido gama-aminobutírico o modificación del mismo (tal como un dimetilo gama-aminobutírico); amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico; y derivados de N-acilhemitioaminal. Mientras que un iNA de la invención puede comprender al menos una modificación química para incluir un engarce y, opcionalmente, incluir además un separador autoinmolativo, un espaciador autoinmolativo preferido puede ser utilizado para la exclusión de un espaciador

autoinmolutivo que no sea el espaciador autoinmolutivo preferido.

5 **[0045]** Los enlazadores que generalmente se consideran como no escindibles incluyen, pero no están limitados a un enlazador de polialquilenglicol que contiene una cadena de dos o más restos de alquileo unidos entre sí por un átomo de oxígeno en la forma de una unión éter (por ejemplo, una cadena que comprende típicamente entre 2 y 10 moléculas de glicol de poli-etileno, tales como PEG-2000 Da); un enlace tioéter (por ejemplo, usando N-succinimidilo-4-(N-maleimidometilo)-ciclohexano-1-carboxilato de etilo); amida (por ejemplo, N-hidrosuccinimida (NHS XX-)); amida extendida (por ejemplo, polietilenglicol N-hidrosuccinimida (NHS-PEG)); enlaces de hidrazida extendidos (por ejemplo, hidrazida-PEG-biotina); cadenas de alquileo C1-10 sustituidas lineales o ramificadas, y uno o más D-aminoácidos.

Restos detectables

15 **[0046]** Un iNA de la invención puede modificarse adicionalmente para incluir al menos una modificación química que comprende la conjugación con resto efector que comprende un resto detectable. La conjugación puede ser directamente entre el iNA y el resto detectable, o puede ser indirectamente a través de un enlazador mediante el enlazador para acoplarse al iNA y para el resto detectable. La elección del tipo de resto detectable puede variar en cuanto a si el uso del iNA modificado es para los métodos de diagnóstico in vitro o en métodos de diagnóstico in vivo. En una realización preferida, el iNA modificado con un resto detectable se utiliza para detectar la presencia o ausencia de una célula diana. En una realización preferida, un resto detectable preferido puede ser utilizado para modificar un iNA de la invención a la exclusión de un resto detectable distinto del resto detectable preferido. Las categorías generales de restos detectables incluyen, pero no se limitan a restos fluorescentes, enzimas, productos químicos, cromóforos, agentes de transferencia de electrones, restos luminiscentes, restos fosforescentes, restos magnéticos, restos radiactivos, marcadores de afinidad, y agentes de contraste (por ejemplo, detectable por tomografía por emisión de tomografía o resonancia magnética). Los restos fluorescentes pueden incluir, pero no se limitan a los puntos cuánticos o nanopartículas semiconductoras fluorescentes; fluoróforos tales como ficoeritrina, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, Cicromas (por ejemplo, Cy 3, 5, y 7), Texas Red, compuestos fluorescentes Alexa (por ejemplo, Alexa 350, 430, 546, 568, 594, 633, 660, y 680), y otras etiquetas orgánicas o colorantes fluorescentes; y proteínas fluorescentes tales como la proteína verde fluorescente, proteína fluorescente azul, proteína fluorescente roja, proteína fluorescente amarilla y proteína fluorescente cian; una molécula aceptora o donante de un sistema de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (por ejemplo, fluoresceína/tetrametilrodamina). Las enzimas pueden incluir, pero no se limitan a beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, y luciferasa. Restos magnéticos pueden incluir, pero no se limitan a diamagnético, paramagnético, o materiales ferromagnéticos tales como perlas o partículas. Radioisótopos pueden incluir, pero no están limitados al yodo-125, tecnecio-99, fósforo-32, azufre-35, gadolinio-157, indio-111, galio-68, rutenio-97, el galio-67, y el cromo-52. Radiometales pueden introducirse en iNAs por quelación del metal con un ligando adecuado de unión (por ejemplo, quelante bifuncional, tal como quelante basado en péptidos MAG2 de tipo N3S) seguido por conjugación al iNA a través de un grupo reactivo. Restos luminiscentes incluyen, pero no se limitan a luciferina, renilla, luminol y otros 2,3-dihidroftalazinedionas. Las etiquetas de afinidad incluyen, pero no se limitan a polihistidinas ("etiquetas His"), avidina, biotina, y similares.

Usos de un iNA que se modifica para incluir al menos una modificación química

45 **[0047]** Como se describe aquí, en una realización un iNA de la invención se puede modificar adicionalmente para incluir al menos una modificación química. En una realización, un iNA que comprende al menos una modificación química comprende un conjugado de iNA con resto efector. Un conjugado de resto de efector iNA puede ser producido mediante la conjugación iNA a una o más moléculas de resto efector (por ejemplo, por acoplamiento de un grupo reactivo del resto efector a un grupo reactivo del iNA), o mediante el uso de un enlazador (por ejemplo, un engarce que tiene al menos dos grupos reactivos, en el que un grupo reactivo se acopla a un grupo reactivo del resto efector, y el otro grupo reactivo del enlazador se acopla a un grupo reactivo del iNA; o cuando el enlazador comprende además un autoespaciador inmolutivo, un grupo reactivo del espaciador autoinmolutivo se acopla a un grupo reactivo del resto efector, y un grupo reactivo del enlazador se acopla a un grupo reactivo del iNA).

55 **[0048]** En una realización, el resto efector comprende un fármaco y, preferiblemente, un fármaco citotóxico, en el que un conjugado de droga iNA se utiliza en una composición de medicamento o farmacéutica para el tratamiento de enfermedades que implican células a las que el conjugado de fármaco iNA se une e interioriza. Así, en un método de uso de un iNA modificado que comprende un conjugado de fármaco iNA, el iNA modificado se pone en contacto con las células diana para ejercer un efecto citotóxico sobre las células diana. Los métodos para determinar si un agente, tal como un conjugado de fármaco, ejerce un efecto citotóxico sobre una célula son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la apoptosis es un indicador comúnmente utilizado para detectar y cuantificar la citotoxicidad. La apoptosis puede ser observada por evaluación microscópica de las células tratadas (por ejemplo, las células apoptóticas se pueden caracterizar por formación de ampollas en la membrana y condensación de citoplasma), o puede medirse cuantificando la fragmentación del ADN (por ejemplo, mediante el ensayo TUNEL o ensayo basado en ELISA), o determinado mediante la medición de cambios morfológicos en las células tratadas (por ejemplo, por pérdida de la actividad de la membrana plasmática que resulta en la absorción de colorante que se puede cuantificar por citometría de flujo u otros medios de detección, o por medición de la unión de anexina V a las células apoptóticas,

tales como mediante citometría de flujo). Estas mismas técnicas pueden utilizarse para evaluar la capacidad citotóxica de un iNA modificado que comprende un conjugado de fármaco iNA.

5 **[0049]** La invención proporciona además una composición, preferiblemente una composición farmacéutica o medicamento, que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de fármaco iNA con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición de acuerdo con la invención puede administrarse una vez, o varias veces, según sea necesario, para suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, por ejemplo, una cantidad eficaz para mediar en la modulación de la enfermedad en el individuo que recibe la composición. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una composición que comprende un conjugado de fármaco iNA-citotóxico puede ser 10 una cantidad que es citotóxica para las células que están en contacto con la composición, como resultado de la captación del conjugado de fármaco iNA-citotóxico. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición dependerá de factores tales como el modo de administración, la formulación para la administración, la enfermedad a ser modulada, el tamaño y la salud del individuo para recibir una composición de este tipo, y otros factores que se pueden tener en consideración por un médico quien sea experto en la técnica de la determinación de las dosis apropiadas para el tratamiento. Una cantidad de la composición a administrarse puede variar de 0,00001 gramos a 15 aproximadamente 5 gramos, y más típicamente de aproximadamente 0,001 gramos a aproximadamente 1 gramo. Un experto en la técnica puede aplicar los principios y modelos de suministro de fármaco y la farmacocinética conocidos para determinar un rango probable de las dosis a ensayar en estudios preclínicos y clínicos para determinar una cantidad terapéuticamente eficaz. Un portador farmacéuticamente aceptable, utilizado en una 20 composición de la invención, puede facilitar uno o más de almacenamiento, la estabilidad, la entrega, y la administración de la composición. El vehículo puede ser en partículas, de manera que la composición puede estar, por ejemplo, en polvo o en forma sólida. El vehículo puede ser en un semi-sólido, gel o fórmula líquida, de modo que la composición puede ser ingerida, inyectada, aplicada, o administrada de otro modo. El vehículo puede ser gaseoso, de modo que la composición puede ser inhalada. Estos portadores son conocidos en la técnica para 25 incluir, pero no se limitan a, agua, solución salina, vehículo adecuado (por ejemplo, liposomas, micropartículas, nanopartículas, emulsión, cápsula), tampón, vehículo parenteral médico, excipiente, solución acuosa, suspensión, disolvente, emulsiones, detergente, agente quelante, agente, diluyente, sal, colorante, polímero, hidrogel, tensioactivo, emulsionante, adyuvante, carga, conservante, estabilizador, aceite, y solubilización como la manera más amplia conocida en la técnica farmacéutica.

30 **[0050]** El modo de administración de un iNA modificado de la invención, u otra composición que comprende un iNA modificado de la invención, puede ser cualquier modo conocido en la técnica por ser adecuado para suministrar una composición farmacéutica, y particularmente adecuada para el tratamiento de una enfermedad tal como cáncer, y puede incluir pero no se limita a administración intravenosa, intraperitoneal, oral, subcutánea, intramuscular, 35 intranasal, transdérmica, por perfusión, y por técnicas peristálticas. Las composiciones de la invención se pueden combinar con otras terapias para el tratamiento de una enfermedad. La terapia de combinación se puede administrar en forma simultánea, secuencial, o en la alternancia de régimen entre la composición de la invención y la otra terapia. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, una composición de la invención se puede combinar en la terapia con uno o más de: al menos un agente quimioterapéutico, la extirpación quirúrgica de las células cancerosas, la 40 inmunoterapia (por ejemplo, incluyendo pero no limitado a la vacunación para inducir respuesta inmune contra las células tumorales, o la transferencia adoptiva de células humanas activadas con antígeno tumoral), y terapia de radiación. Al menos un agente quimioterapéutico, que se puede usar en terapia de combinación con una composición que comprende un conjugado de fármaco iNA de acuerdo con la invención, puede incluir, pero no se limita a un agente de alquilación (por ejemplo, cisplatino), un alcaloide de la planta (por ejemplo, un alcaloide de la 45 vinca o taxoide), un inhibidor de la topoisomerasa de ADN (por ejemplo, mitomicinas o epipodofilinas), agente anti-hormonal, un agente anti-folato (por ejemplo, metotrexato), análogos de pirimidina, bloqueador de receptor o antagonista o ligando (por ejemplo, ligando de receptor gamma de peroxisoma activado por proliferador (PPAR- γ), anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-EGFR), e inhibidores del ciclo celular. En un aspecto, al menos un agente quimioterapéutico, que se utiliza en terapia de combinación, es un agente al que el tumor a tratar se ha determinado 50 que no es refractario. Las combinaciones seleccionadas, momento de administración, el orden de administración y la dosificación pueden determinarse por, y están bien dentro de las capacidades de, un médico experto en la técnica para el tratamiento de cáncer. De acuerdo con los presentes procedimientos, una composición que comprende un conjugado de fármaco iNA se administra a un individuo que tiene, o está en riesgo de tener, un cáncer que comprende células diana. Por "individuo" se quiere decir un mamífero, y más preferiblemente un humano. Como se describe aquí con más detalle, varios métodos conocidos en la técnica se pueden usar para determinar si o no un 55 cáncer comprende células diana. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a citometría de flujo, inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa, y formación de imágenes de diagnóstico in vivo. La composición se administra a dicho individuo con el fin de conseguir una concentración de droga, administración por el iNA de la invención, en el área del tumor eficaz para lograr el resultado deseado, por ejemplo, para ser citotóxico para el tumor en el tratamiento, prevención y/o mejorar cáncer asociado con la expresión de una molécula de 60 superficie de la célula a la que el iNA tiene especificidad de unión. Los ejemplos de cáncer a tratar por los métodos y composiciones de esta invención pueden incluir, pero no se limitan a, tumores linfoides sólidos, leucemia, y neoplasias linfoides. Los tumores pueden incluir cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de piel, cáncer cervical, cáncer renal, cáncer de endometrio, glioblastoma, 65 linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfomas de células B, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfoblástica

aguda, leucemia linfocítica crónica, y leucemia mielógena crónica. El uso de métodos estándar conocidos en la técnica, la eficacia de una composición que comprende un conjugado de fármaco iNA contra un tipo o de la muestra de tumor particular se puede ensayar en modelos animales estándar conocidos en la técnica para ese tumor, y/o en ensayos basados en células, seguido por ensayos clínicos.

5 **[0051]** En una realización, el resto efector comprende un resto detectable, en el que una composición que comprende un iNA acoplado al resto detectable se usa en un método para detectar la presencia o ausencia de resto detectable en una muestra sospechosa de contener células diana. Tal muestra puede incluir, pero no se limita a las células, tejidos (por ejemplo, una biopsia, si el proceso de detección es in vitro, o de diagnóstico por imagen, si el proceso de detección es in vivo), o un fluido biológico (por ejemplo, sangre, plasma, suero, derrames producidos por o asociados con tumor, extractos tumorales o homogeneizados o lisados, saliva, orina, y linfa). Por lo tanto, dependiendo de la naturaleza de la muestra, el iNA podría unirse a la molécula de células para la que tiene especificidad de unión en la que la molécula de célula puede presentarse en una o más formas tales como presente como una molécula de superficie celular en las células diana; y liberado de una célula (por ejemplo, tal como mediante la secreción o formación de vesículas de la molécula de célula a partir de una célula diana, o tal como por tratamiento enzimático o de solubilización (por ejemplo, tratamiento iónico y/o con detergente) de las células diana, o como resultado de producirse de forma recombinante por células manipuladas genéticamente para expresar una molécula de célula a la que la molécula de ácido nucleico tiene especificidad de unión).

20 **[0052]** En un método de detección de la presencia o ausencia de células diana en una muestra sospechosa de contener células diana, el método comprende: hacer reaccionar la muestra con una composición que comprende un iNA acoplado al resto detectable; determinar la presencia o ausencia de resto detectable en las células contenidas en la muestra; donde la detección de la presencia de la fracción detectable en las células es un indicador de que las células diana están presentes en la muestra, y en el que la ausencia de la detección de la fracción detectable es un indicador de que las células diana están ausentes de la muestra. Detectar y cuantificar la cantidad de resto detectable que se une a, o se administra en la muestra (a través de la unión del iNA, al cual se acopla el resto detectable, a la muestra) se puede lograr por cualquier método conocido en la técnica incluyendo in vivo los métodos de detección (por ejemplo, imágenes de diagnóstico, incluyendo pero no limitado a la tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada por emisión de fotón único, la resonancia magnética, radioinmunoquímica), y en métodos in vitro de detección (por ejemplo, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia confocal, ELISA, grano (por ejemplo, magnética o de plástico) de clasificación, inmunotransferencia, inmunotinción, ensayos de inmunoprecipitación ("inmuno", en este contexto, significa la unión del iNA a su ligando, en lugar de la función del anticuerpo en el ensayo correspondiente). Las condiciones de reacción y el tiempo de incubación pueden variar en función del formato de ensayo y el tipo de muestra analizada, y está dentro de las habilidades de un experto en la técnica. Para diagnóstico por imagen se utiliza un iNA y una radioisotopo, los métodos conocidos en la técnica para los aptámeros de etiquetado se pueden utilizar. Por ejemplo, aptámeros de ARN se han marcado con tecnecio u otros radiomarcadores complejados con uno de una variedad de quelantes bifuncionales que llevan grupos reactivos de ácido carboxílico. Con respecto a tecnecio, los complejos se forman por reducción de pertechnetato con borohidruro de sodio, seguido de tratamiento con una solución del quelante (por ejemplo, mesotetraquis (*p*-carboxifenilo) porfirina, mercaptoacetilglicilglicilglicina (MAG3), 1,4,7,10-tetraazaciclododecano- N,N,N,N"-tetraaceticácido (DOTA), y un ciclen). Los complejos se conjugaron sin aislamiento a un grupo amino 3' del aptámero usando químicas estándar.

45 **[0053]** En otro ejemplo, el iNA se modifica para comprender un resto detectable apropiado para tomografía de emisión de la tomografía (imágenes "PET"). En este ejemplo, una o más moléculas iNA (por ejemplo, en formato monovalente o multivalente) es conjugado a un derivado de aminoácido de azúcar radiomarcado. Por ejemplo, los derivados del ácido amino azúcar radiomarcado utilizados comúnmente en formación de imágenes PET de tumores incluyen, pero no se limitan a [¹⁸F] galactosamina ("["¹⁸F] galacto") y [¹²⁵I] glucosamina ("["¹²⁵I] gluco"), ya que los azúcares como galactosa y glucosa son fuentes de combustible importante para las células cancerosas. Un iNA modificado con un derivado de ácido amino azúcar radiomarcado puede resultar en un radiotrazador diana útil para obtener imágenes de las células diana que comprenden las células cancerosas. Un ejemplo ilustrativo de la producción de un iNA modificado es por un método de condensación de fragmentos en fase sólida. La molécula de ARN que comprende el iNA se ensambla en un sintetizador de ácidos nucleicos automatizado, y se modifica en el extremo 5' con carbonildiimidazol, etilendiamina, y hexametilén-1,6-diisocianato, sucesivamente en fase sólida. A este iNA modificado por isocianato está acoplado un amino azúcar (por ejemplo, D-glucosamina o D-galactosamina) a temperatura ambiente. El conjugado se trata después con amoníaco acuoso a 50°C durante 6 horas, y el producto se purificó a continuación, tal como por cromatografía inversa de líquidos de alto rendimiento de fase (HPLC). El derivado de amino azúcar del iNA modificado puede entonces marcarse con el radioisótopo utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Alternativamente, un derivado de amino azúcar radiomarcado se acopla al iNA modificado por isocianato. El radiotrazador de iNA modificado resultante puede entonces ser administrado usando métodos conocidos en la técnica para la administración de radiotrazadores para formación de imágenes PET.

EJEMPLO 1

65 **[0054]** En este ejemplo, se ilustra el proceso de selección por el cual se seleccionó una biblioteca de moléculas de ARN (por ejemplo, con una diversidad de aproximadamente 10¹⁴ moléculas por biblioteca) y se cribó para la unión y

la internalización en una o más líneas celulares humanas de carcinoma de próstata, en la generación de un iNA que se une a y se internaliza en células de cáncer de próstata. Las pirimidinas en el ARN usado en estas selecciones fueron modificadas por 2'-fluoro con el fin de proteger las moléculas de ARN de ribonucleasas (RNAsas extracelulares), y por lo tanto hacerlas más adecuadas para su uso in vivo. La biblioteca se compone de moléculas de ARN que contienen una región constante (que comprende bases de ácido nucleico en las posiciones 1-15 de la SEQ ID NO: 21) que flanquean el extremo 5' de la región variable y una región constante (que comprende bases de ácido nucleico en las posiciones 56-83 de SEQ ID NO: 21) que flanquea el extremo 3' de la región variable y la región variable que se ha designado por N(40). Dos variaciones del método de selección básico para moléculas de ácido nucleico de la célula de internalización (véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2009/0170711) se utilizaron en paralelo para generar una que tiene especificidad de unión iNA para las células de cáncer de próstata. Ambos procesos de selección fueron dirigidos a la generación de un iNA que se internaliza en las células humanas de cáncer de próstata (por ejemplo, líneas celulares, o las células tumorales primarias). Por lo tanto, fue sorprendente que se generó un iNA que se unió a y se internalizó en células de cáncer humano representativo de varios tipos de tumores malignos (por ejemplo, además de las células de cáncer de próstata), así como a células de cáncer humano de diversas etapas de malignidad. Como se muestra en la Tabla 2, en un proceso de selección, se utilizaron células de cáncer de PC-3 de la próstata. Como se muestra en la Tabla 3, otro proceso de selección se alternó entre diversas líneas celulares de cáncer de próstata humano. La conmutación entre las diversas líneas celulares era un medio para aplicar presión selectiva para la identificación de moléculas de ARN que podría internalizarse en líneas celulares de cáncer de próstata humano que representan diferentes etapas de la malignidad en el cáncer de próstata humano. Por ejemplo, células de cáncer de próstata LNCaP (ATCC número CRL-1740) representan la fase maligna de la dependencia de andrógenos con alta capacidad de respuesta a andrógenos; células de cáncer de próstata PC-3 (ATCC Número CRL-1435) representan la fase maligna de la independencia de andrógenos; células de cáncer de próstata DU 145 (ATCC Número HTB-81) representan la etapa maligna de metástasis en el cerebro; y células de cáncer de próstata 22Rv1 (ATCC Número CRL-2505) representan la fase maligna de la dependencia de andrógenos con baja capacidad de respuesta a andrógenos.

[0055] Si bien las Tablas 2 y 3 resumen el número de rondas de selección, se usó la entrada de ARN en cada ronda, y las células utilizadas en cada ronda, y si se utilizó o no la RNasa para eliminar las moléculas de ARN unidas a la superficie celular, el resto del método de selección básico era esencialmente igual para cada proceso de selección. En cada ronda del proceso de selección, se introdujeron aproximadamente 4×10^5 células en un pocillo de una placa de 6 pocillos, y se hicieron crecer a entre 50% y 80% de confluencia antes del tratamiento con la entrada de ARN apropiado (por ejemplo, las moléculas de la biblioteca eran de entrada para la ronda 1; ARN internalizado aislado de una ronda previa era la entrada para una ronda posterior de selección). En resumen, la ronda 1 del proceso de selección se inició mediante la incubación de 1 mM de la biblioteca de ARN a las células en 2 ml de PBS (que contiene 2 mg/ml de BSA, 0,2 mg/ml de ARNt, 5 mM $MgCl_2$), y las células se incubaron durante 4 horas a 37°C. La biblioteca se eliminó, las células se lavaron en 5 ml PBS, y luego las células se tripsinizaron con 2 ml de tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C. La tripsina se neutralizó con 5 ml de medio completo, y las células se eliminaron en un tubo cónico. La placa se lavó con 5 ml de PBS para eliminar cualquier resto de las células, y estas células se combinaron con las células en el tubo cónico. Las células se sedimentaron por centrifugación, y después se lavaron con 10 ml de PBS. Las células en el sedimento se resuspendió en 0,5 ml de PBS que contiene 20 U de RNasa (Riboshredder™), se incubaron a 37°C durante 20 minutos, y después se lavaron 3 veces en 10 ml PBS. Se lisaron las células con 1 ml de reactivo Trizol, y el ARN total se extrajo y se purificó usando un procedimiento de proveedor recomendado. El ARN total se invirtió transcrito en ADNc utilizando un cebador específico para la región conservada de la biblioteca de ARN (DPA845 ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT; SEQ ID NO: 17) A continuación, ADNc es amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (DPA843; SEQ ID NO: 18; TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGCTAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG y DPA845 ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT (SEQ ID NO: 17)), y el ADN amplificado se transcribe a continuación, en moléculas de ARN. Esto completa la primera ronda del proceso de selección. El ARN resultante sirve como la entrada de ARN para la siguiente ronda en el proceso de selección. Como se ha indicado en las Tablas 2 y 3, después de las primeras rondas del proceso de selección, y después de la aplicación de la entrada de ARN a las células, pero antes de la lisis de las células para aislar el ARN total, las células se trataron con una solución que contiene RNasa (por ejemplo, 20 ml de una solución que contiene RNasa @1U/uL en 0,5 ml de PBS, con incubación durante 20 minutos a 37°C) para eliminar la entrada de ARN unido a la superficie celular. El tratamiento de las células con RNasa ayudó a destruir entrada ARN unida a la superficie celular de modo que tras la recuperación de ARN total y posterior amplificación de la entrada de ARN, sustancialmente toda la entrada de ARN amplificado representa la entrada de ARN que ha sido internalizado en las células. Como se ha indicado en las Tablas 2 y 3, ya que el proceso de selección progresa a través de múltiples rondas, la cantidad de entrada de ARN se puede disminuir a fin de aumentar la presión de selección para la internalización. Típicamente, después de varias rondas de selección, y antes de su uso para iniciar la siguiente ronda de selección, las moléculas de ARN resultantes se clonaron y secuenciaron para la comparación de las moléculas de ARN individuales de esa ronda para detectar la convergencia de secuencias de nucleótidos (que, cuando se detecta, es una indicación de que el proceso de selección se aproxima o ha llegado a su conclusión). Como se muestra en las Tablas 2 y 3, el proceso de selección se completó después de la ronda 9 y ronda 14, respectivamente.

65

Tabla 2- Selección de células de cáncer de próstata humano PC-3

Nº de ronda	Tipo de célula	Concentración de entrada de ARN	Tratamiento de RNasa
1	PC-3	1uM	-
2	PC-3	500 nM	-
3	PC-3	500 nM	+
4	PC-3	250 nM	+
5	PC-3	250 nM	+
6	PC-3	250 nM	+
7	PC-3	250 nM	+
8	PC-3	250 nM	+
9	PC-3	250 nM	+

Tabla 3- Selección alterna utilizando diversas células de cáncer de próstata humano

Nº de ronda	Tipo de célula	Concentración de entrada de ARN	Tratamiento de RNasa
1	LNCaP	1uM	-
2	PC-3	500 nM	-
3	PC-3	500 nM	-
4	PC-3	500 nM	+
5	PC-3	500 nM	+
6	PC-3	500 nM	+
7	DU 145	500 nM	+
8	DU 145	250 nM	+
9	22Rv1	250 nM	+
10	22Rv1	250 nM	+
11	22Rv1	250 nM	+
12	PC-3	250 nM	+
13	PC-3	250 nM	+
14	PC-3	250 nM	+

[0056] Tras el análisis de las regiones variables de las secuencias de ácidos nucleicos a partir de clones aislados de rondas 7 y 9 del proceso de selección con células humanas de cáncer de próstata PC-3 y a partir de clones aislados a partir de ronda 14 del proceso de selección de palanca, fue sorprendente observar que no sólo no había evidencia de una convergencia de secuencia compartida por los dos procesos de selección, sino también que los clones de secuencia idéntica se aislaron de ambos procesos de selección (véase, Tablas 4 y 5). Esto fue un hallazgo sorprendente, ya que se utilizó en el proceso de selección de palanca, pero no en el otro proceso de selección, una variedad de líneas celulares de cáncer de próstata humano que representan diferentes etapas de la enfermedad maligna en el cáncer de próstata humano. Los ejemplos ilustrativos de los iNAs aislados a partir de las selecciones anteriores, para un iNA capaz de internalizarse en las células del cáncer de próstata humano que representan diferentes etapas de malignidad, se muestran en la Tabla 4; donde las secuencias de ácido nucleico que comprenden SEQ ID NOs: 19 y 20 representan las regiones variables de clones con afinidad para las células de cáncer de próstata humano de unión; y una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID: 21 representa las regiones constantes de la biblioteca de ARN, con una región constante (que comprenden bases de ácido nucleico en las posiciones 1-15 de la SEQ ID NO: 21) que flanquean el extremo 5' de las regiones variables, y una región constante (que comprende bases de ácido nucleico en las posiciones 56-83 de la SEQ ID NO: 21) que flanquean el extremo 3' de las regiones variables, y las regiones variables designadas por N(40) en la Tabla 4 (bases de ácido nucleico en las posiciones 16-55 de SEQ ID NO: 21). Algunas de las secuencias de la región variable de iNA enumeradas en la Tabla 4 representan clones que aparecen varias veces en un proceso de selección. Se entiende por los expertos en la técnica que las regiones variables pueden ser flanqueadas por regiones constantes distintas de las que comprenden las regiones constantes representadas en SEQ ID NO: 21, mientras que todavía conserva la actividad de unión para la molécula de superficie celular en las células diana para las que secuencias de ácido nucleico representadas por SEQ ID NOs: 19 y 20 tienen afinidad de unión, y la capacidad para mediar la internalización en las células diana (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3, en el presente documento). A menos que se indique lo contrario, las secuencias individuales enumeradas a continuación en la Tabla 4 se representan en la orientación 5' a 3', y se derivaron a partir de clones en los que todo el trifosfato de citidina y trifosfato de uridina son 2' fluoro.

Tabla 4

	SEQ ID No: ; y clon id	Secuencias de ácido nucleico 5' a 3'	Proceso de selección
5	19; E3	<u>UACUUUCGGGCUUUCGGCAACAUCAGCCCCUCAGGACGCA</u>	Ronda 9 PC-3
	19; C9	<u>UACUUUCGGGCUUUCGGCAACAUCAGCCCCUCAGGACGCA</u>	Ronda 14 selección
10	20; D11	<u>UCCCCGAUUUCGGAUACGAUCCCUCAUCCCUUGACCGCA</u>	Ronda 14 selección
15	21	GGGAGGACGAUGC GGNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAUUUCUCCUACUGGGAUAGGUGG AUUAU	biblioteca

[0057] Como se muestra en la Tabla 4, el análisis de estos clones reveló secuencias de la región aleatoria únicas que contienen motivos conservados, indicados mediante subrayado. Estos motivos conservados comprenden lo siguiente. En su forma más básica, un motivo conservado comprende, en una dirección 5' a 3', la secuencia contigua que consiste en UUUCGG. En forma expandida, el motivo conservado comprende (UUUCGG)_N(UUUCGG)_n (SEQ ID NO: 22), en el que n es un número de uno a cuatro, y entre repeticiones UUUCGG es uno o más nucleótidos N, en donde N puede ser cualquier uno o más de A, U, C o G, y m es un número de 0 a 4 para indicar el número de bases N (véase, por ejemplo, la Tabla 4). Mediante el uso de algoritmos de plegado ARN estándar en la técnica (por ejemplo, plegado ARN por el algoritmo de m veces) para predecir la estructura secundaria de las moléculas de ARN, es evidente que un iNA de la invención comprende al menos una estructura de tallo-bucle comprende uno o más motivos más conservados que comprende una secuencia de nucleótidos, notación 5' a 3', que comprende uno o más de UUUCGG, y (UUUCGG)_N(UUUCGG)_n (SEQ ID NO: 22). Preferiblemente, un motivo conservado está presente en al menos una porción de bucle, o en al menos una porción de bucle y una parte de una porción de tallo conectado a (por ejemplo, los nucleótidos apareados con bases a partir de los cuales se extiende el bucle) tal porción de bucle, de la estructura de tallo-bucle. Como se muestra en la FIG. 1A, el motivo conservado comprende los nucleótidos que aparecen como nucleótidos contiguos o consecutivos en la parte de bucle de una estructura de tallo-bucle, o en una parte de bucle y una parte de una parte de tallo conectada a dicha porción de bucle (véase, por ejemplo, la FIG. 1B (D11)). También se muestra en la Tabla 4, y la FIG. 1A, el motivo conservado UUUCGG puede aparecer más de una vez en la estructura de, y la secuencia de, un iNA.

EJEMPLO 2

[0058] En este Ejemplo, se ilustra la caracterización de clones seleccionados para su posterior análisis del proceso de selección descrito en el Ejemplo 1 en el presente documento. Además, se ilustran iNAs que se unen a y se internalizan en las células diana, que se modifican adicionalmente para incluir al menos una modificación química que comprende la conjugación con resto efector que comprende un resto detectable. En esta ilustración de la invención, el iNA se modifica adicionalmente para comprender un resto detectable que comprende un resto fluorescente. En este ejemplo, el resto fluorescente comprende Alexa 647. Los clones se eligieron para su posterior análisis del proceso de selección descrito en el Ejemplo 1 en el presente documento sobre la base de la secuencia de la convergencia. Los clones seleccionados, y moléculas de iNA, fueron modificadas para comprender, además, Alexa 647 por los siguientes métodos. Varios clones cuyas secuencias aparecían varias veces en el análisis de secuencias se transcribieron con una extensión 3' (CACGAGAGGUCCUGCGAAGC; SEQ ID NO: 23), hibridada con un oligo de ADN marcado con Alexa647 (ALX647-GCTTCCGGAGGACCTCTCGTG; SEQ ID NO: 24), y se aplicó a las células para su análisis.

[0059] Al ilustrar un proceso de selección para la internalización, a partir de clones seleccionados para el análisis adicional del proceso de selección, se utilizó un ensayo basado en citometría de flujo para la unión y/o internalización. Típicamente, el ensayo se realizó mediante la incubación de 200 nM de cada clon con 5×10^5 células diana en 100 μ l de PBS que contienen 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA) en un tubo de 13 mm durante 2 horas @ 37°C. Una primera porción de las células a continuación se trató con ARNasa para eliminar cualquiera del clon restante unido a la superficie de las células, a fin de permitir la detección y cuantificación de clon internalizado (es decir, la medición de la internalización). En paralelo, una segunda porción de las células fue tratada con PBS que contenía 0,5% de BSA (que carece de actividad RNasa añadida para escindir proteínas de superficie celular enzimáticamente), a fin de permitir la detección y cuantificación de clon que permanece unida a la superficie celular, así como clon internalizado (es decir, midiendo la unión y la internalización). Después de lavados adicionales con solución salina tamponada con fosfato, las células se fijaron en formaldehído al 1% y después se sometieron a análisis en un citómetro de flujo utilizando software de análisis disponibles comercialmente. En la realización de análisis por citometría de flujo, se utilizaron varios controles de ensayo. Como un control de ensayo que representa ya sea sin o con internalización de fondo (por ejemplo, no específica), una molécula de ARN que resulta de un proceso de selección para unirse a una molécula no expresada de forma detectable en las células diana. La molécula de ARN de control de ensayo se modificó adicionalmente con Alexa 647, y luego se usa para la

caracterización adicional de clones del proceso de selección descrito en este documento. Para facilitar la descripción y de referencia para este ejemplo, esta molécula de ARN de control de ensayo se denomina en este documento como control negativo 1 (véase, por ejemplo, Tabla 5). Como un control de ensayo adicional que representa ya sea ninguna internalización o internalización de fondo, utilizada fue una molécula de ARN a partir de la biblioteca de partida que fue elegida de la biblioteca antes de comenzar un método de selección descrito en el presente documento, y que se modificó adicionalmente con Alexa 647. Esta molécula de ARN de control de ensayo se denomina en la presente memoria como control negativo 2 (véase, por ejemplo, las Tablas 5, 7, y 8). Además, se midió la fluorescencia de las células no teñidas, como control, para cuantificar las propiedades fluorescentes de fondo de las propias células como se encuentra en los análisis por citometría de flujo ("no teñida"), en oposición a la señal fluorescente mediada por las moléculas de ARN modificadas aún más para incluir Alexa 647. Se muestra en la Tabla 5 los resultados de los análisis por citometría de flujo en la que se midió y se cuantificó la capacidad de los clones, seleccionados sobre la base de la secuencia de convergencia, de internalizar en las células diana representadas por línea celular de cáncer de próstata humano PC-3. Las unidades de fluorescencia en la Tabla 5 representan la media de fluorescencia ("media"). El aumento en veces (determinado mediante la división de la media de fluorescencia de un clon de la fluorescencia media de las células no teñidas) es un indicador de la capacidad de un clon, o un clon que ha sido modificado para incluir un resto efector, para internalizar en las células diana (Tabla 5; "El aumento de veces").

Tabla 5- Ensayo de cribado de internalización en las células PC-3

	Media	Aumento de veces
No teñido	79,9	
Control Negativo 1	138	1,7
Control Negativo 2	136	1,7
E3 (SEQ ID NO:39)	665	8,3
D11 (SEQ ID NO:38)	460	5,8

Los resultados mostrados en la Tabla 5 ilustran que, como se muestra mediante un ensayo de cribado basado en la citometría de flujo para la internalización, clones E3 y D11 son moléculas iNA, ARN que median la internalización en las células. Como se describe en más detalle en el Ejemplo 1 en el presente documento, los clones más eficientes en la mediación de la internalización tienen en un motivo conservado común que consiste en 5' UUUCGG 3'. Estos resultados también muestran que iNA de la invención puede ser modificado adicionalmente con al menos una modificación química que comprende un resto efector que comprende un resto detectable, y tal iNA químicamente modificado se puede usar entonces en un método para detectar la presencia o ausencia de células diana en una muestra sospechosa de contener células diana. Además se ilustra, en este ejemplo, un método para suministrar específicamente un resto efector en las células cancerosas, que comprende las etapas de poner en contacto las células cancerosas con un iNA que está acoplado a un resto efector, en donde el iNA se une específicamente a una molécula de la superficie celular para que el iNA tiene especificidad de unión, en el que el resto efector se administra en las células de cáncer de unión.

EJEMPLO 3

[0060] Para las condiciones de síntesis óptimas para iNAs que comprenden al menos una estructura de tallo-bucle que comprende uno o más motivos conservados y que tienen la capacidad de unirse e internalizar en las células diana, es deseable que se identifique un requisito mínimo de secuencia de ARN por la unión y internalización en las células diana. Por ejemplo, como se muestra en las figuras 1A y B, la estructura secundaria de un iNA de la invención se prevé por el algoritmo plegable de ARN MFOLD para comprender una estructura de bucle-tallo que comprende múltiples bucles y tallos, donde al menos una estructura de tallo-bucle comprende un motivo conservado de uno o más de UUUCGG que comprende los nucleótidos que aparecen como nucleótidos contiguos o consecutivos en la parte de bucle de la estructura de tallo-bucle (véase, por ejemplo, la FIG. 1A (E3)), o en una porción de bucle y parte de una porción conectada a dicha parte de bucle de la estructura de tallo-bucle (véase, por ejemplo, la FIG. 1B, (D11)) del tallo. En un aspecto de la invención, como se muestra en la FIG. 1A y la FIG. 1B, la al menos una porción de bucle, que contiene el motivo conservado de un iNA de la invención, de una estructura de bucle-tallo (que contiene dos o más partes de bucle) es una parte de bucle contiguo o en contacto por dos porciones del tallo (es decir, la porción de bucle es una parte de bucle interno a la estructura de tallo-bucle), como se distingue de una porción de bucle en el extremo de una estructura de tallo-bucle contiguo o en contacto con sólo una parte de tallo (tal como se predijo por el programa de plegamiento de ARN).

[0061] Para ilustrar la modificación de un iNA según la invención por truncamientos, un iNA representativo mostrado en la Tabla 4 y la FIG. 1A se sometió a truncamientos de uno o ambos de región constante 5' o región constante 3'. En el diseño de las moléculas de ARN truncadas, se añadieron algunas bases adicionales para uno o más de (a) el

aumento de la longitud de la estructura de tallo adyacente del bucle que comprende el motivo conservado en los esfuerzos para estabilizar la estructura como una estructura de tallo bucle (por ejemplo, mediante la adición de una o más bases en el extremo de la estructura de tallo relevante que podría emparejarse por pares de bases Watson-Crick con una o más bases añadidas al extremo 3' de la estructura de tallo relevante); y (b) la adición de secuencias de iniciador para polimerasa T7, en el caso de que se desea producir la molécula de ARN por transcripción (véase, por ejemplo, la FIG. 3, los últimos 5 nucleótidos, CACCC, en el extremo 3' para cada secuencia de ácido nucleico mostrada). Sin embargo, como es evidente para un experto en la técnica, las secuencias de iniciadores se pueden eliminar si la molécula ha de sintetizarse químicamente frente a sintetizarse enzimáticamente. Las secuencias de nucleótidos de los truncamientos resultantes comprenden 62 bases, 45 bases, 32 bases, y 22 bases, respectivamente, de la secuencia de iNA de partida que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 39 (véase la Tabla 6, con un motivo conservado ilustrado por secuencia subrayada). Como se muestra en las FIGS. 2A-D, de algoritmos de plegamiento ARN MFOLD predijeron estructuras secundarias para cada truncamiento ilustrado en la Tabla 6 para comprender al menos una estructura de bucle de tallo comprende al menos un motivo conservado (como se describe en el Ejemplo 1 en el presente documento). A menos que se indique lo contrario, las secuencias individuales enumeradas a continuación en la Tabla 6 se representan en la orientación 5' a 3', y se derivaron de las moléculas de ARN que comprenden truncamientos de un iNA de la invención, en el que todo el trifosfato de citidina y trifosfato de uridina son 2' fluoro.

Tabla 6 Truncamientos del iNA (E3)

Clon id & SEQ ID No:	Secuencias de ácido nucleico 5' a 3'
E3; SEQ ID NO:39	GGGAGGACGAUGC <u>GGUACUUUCGGGCUUUCGGCAACAUCAGCCCCUC</u> AGGACGCAUUUCUCCUACUGGGAUAGGUGGAUUAU
E3-62; SEQ ID NO: 25	GGGAGGACGAUGC <u>GGUACUUUCGGGCUUUCGGCAACAUCAGCCCCUC</u> AGGACGCAUUUCUC
E3-45; SEQ ID NO: 26	GGGUGCGGUAC <u>UUUCGGGCUUUCGGCAACAUCAGCCCCUCAGGACG</u>
E3-32; SEQ ID NO: 27	GGGAGGCUUUC <u>GGGCUUUCGGCAACAUCAGCC</u>
E3-22; SEQ ID NO: 28	GGGAGGCU <u>GGGCUUUCGGCAAC</u>

[0062] Los truncamientos, que se ilustran en la Tabla 6, fueron modificados adicionalmente con un resto detectable, Alexa 647, y se analizaron mediante un ensayo de selección basado en la citometría de flujo para la internalización utilizando los métodos esbozados en el Ejemplo 2, para determinar las secuencias mínimas que mantienen la plena capacidad de internalizar en las células de cáncer de próstata humano. Se muestran en la Tabla 7 los resultados de los análisis por citometría de flujo en la que se midió y se cuantificó la capacidad de cada truncamiento de internalizarse en las células diana representadas por línea celular de cáncer de próstata humano PC-3. Las unidades de fluorescencia en la Tabla 7 representan la intensidad de fluorescencia media ("Media"). El aumento de veces (determinado mediante la división de la intensidad de fluorescencia media de un truncamiento por la intensidad media de fluorescencia de las células no teñidas) es un indicador de la capacidad de un truncamiento, o un truncamiento que se ha modificado adicionalmente para incluir un resto efector, para internalizar en las células diana (Tabla 7; "aumento de veces").

Tabla 7- Ensayo de cribado de internalización en las células PC-3

	Media	Aumento de veces
No teñido	80,2	
Control Negativo 1	----	
Control Negativo 2	129	1,6
E3	907	11,3
E3-62	858	10,7
E3-45	690	8,6
E3-32	944	11,8
E3-22	80,7	1,0

[0063] Los resultados de la Tabla 7 ilustran que, como se muestra mediante un ensayo de cribado basado en la citometría de flujo para la internalización y el uso de una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 39 (E3) como una ilustración, tras la selección inicial de iNAs, tales iNAs pueden ser reducidos aún más en longitud y todavía mantienen la capacidad de internalizar en las células diana; y que dichos iNAs truncados pueden comprender al menos una modificación química (por ejemplo, para comprender, además, un resto efector) y retienen la capacidad de internalizar en las células diana. Como se describe en más detalle en el Ejemplo 1 en el presente documento, estos iNA truncados tienen en común un motivo conservado que comprende uno o más 5' UUUCGG 3'. Las secuencias de ácidos nucleicos de iNA truncado, que comprenden uno o más motivos conservados, pueden ser sintetizados por técnicas convencionales sintéticas (por ejemplo, síntesis lineal) o técnicas bioquímicas (técnicas por ejemplo, recombinantes, o procesos enzimáticos, tales como la transcripción). Además, las regiones constantes del iNA y la región variable del iNA pueden comprender además una modificación química que comprende una o más deleciones, sustituciones o adiciones de nucleótidos, siempre que el plegamiento correcto del iNA se mantiene de tal manera que el motivo conservado contenido en una estructura de tallo-bucle demuestra la unión y la internalización en las células diana. Usando algoritmos de ARN de plegado convencionales (por ejemplo, el algoritmo de MFOLD) conocido en la técnica, y los ensayos descritos en el presente documento en los Ejemplos 1-3, un experto en la técnica sería capaz de predecir con posibilidad razonable de éxito en la que dichas alteraciones de uno o de más de la región constante del iNA, o región variable que rodea el motivo conservado del iNA, afectará o no afectará la apariencia del motivo conservado en la porción de bucle de dicha estructura de tallo-bucle, así como afectar o no afectar a la capacidad de unión y la internalización de iNA modificado resultante.

EJEMPLO 4

[0064] En este Ejemplo, se ilustra la función del motivo conservado en la especificidad de unión del iNA a su ligando, y dando como resultado la internalización. Una serie de siete mutantes se crearon por mutagénesis dirigida al sitio, usando el método de Kunkel y oligonucleótidos mutagénicos que contienen las sustituciones de bases deseadas de modo que las mutaciones específicas se insertaron en la ubicación deseada en la secuencia de ácido nucleico iNA (véase, por ejemplo, la FIG. 3). Mutadas eran porciones diferentes de una porción de bucle, de una estructura de tallo-bucle, que contiene un motivo conservado (UUUCGG) se espera que sea responsable de la función (la unión al ligando y la subsiguiente internalización) del iNA (véase, por ejemplo, la FIG. 3, mutantes 2-8). Las mutaciones fueron diseñadas de tal manera que, como se predijo por los algoritmos de ARN-plegables, mantenida es la estructura de tallo-bucle; es decir, las mutaciones no dieron como resultado la pérdida de la porción de bucle mutada. También, como un control de ensayo, se realizó una mutación en un bucle del iNA que no se espera que sea responsable de la función del iNA (véase, por ejemplo, la FIG. 3, mutante 1). Utilizando los métodos esencialmente como se describe en el presente documento en los Ejemplos 1 y 2, se utilizó un ensayo de cribado basado en la citometría de flujo para la internalización para determinar el efecto de la mutación de la capacidad de internalizar en las células de cáncer de próstata humanos. Se muestran en la Tabla 8 son los resultados de los análisis por citometría de flujo en el que se midió y se cuantificó la capacidad de cada mutante de internalizar en las células diana representadas por línea celular de cáncer de próstata humano PC-3. Las unidades de fluorescencia en la Tabla 8 representan la intensidad de fluorescencia media ("media"). El aumento en veces (determinado mediante la división de la intensidad de fluorescencia media de un mutante por la intensidad media de fluorescencia de las células no teñidas) es un indicador de la capacidad (o incapacidad) de una mutación en el iNA de internalizar en las células diana (Tabla 8; "Veces de aumento").

Tabla 8- Ensayo de cribado de internalización de los mutantes en las células PC-3

	Media	Aumento de veces
No teñido	86,4	
Control Negativo 2	158	1,8
E3-45 (SEQ ID NO:26)	470	5,4
mutante 1 (SEQ ID NO:29)	405	4,7
mutante 2 (SEQ ID NO:30)	127	1,5
mutante 3 (SEQ ID NO:31)	142	1,6
mutante 4 (SEQ ID NO:32)	176	2,0
mutante 5 (SEQ ID NO:33)	164	1,9
mutante 6 (SEQ ID NO:34)	167	1,9
mutante 7 (SEQ ID NO:35)	153	1,8
mutante 8 (SEQ ID NO:36)	130	1,5

Como se muestra en la Tabla 8, y el control de ensayo (FIG. 3, mutante 1) mutando una porción de bucle de una estructura de tallo-bucle en la que la porción de bucle no contiene el motivo conservado UUUCGG, resulta en una capacidad de internalizar por igual, en comparación a la del iNA de tipo salvaje (no mutado) (E3-45; FIG. 3, WT, SEQ ID NO: 26). Sin embargo, la mutación del motivo conservado, UUUCGG, en cualquiera de las partes de bucle

de una estructura de tallo-bucle ((véase, por ejemplo, los mutantes 2, 3, y 4, FIG. 3), resulta en la pérdida de la capacidad para unirse e internalizar (véase, por ejemplo, los mutantes 2, 3, y 4, Tabla 8) en comparación con la del iNA de tipo salvaje (E3-45; FIG. 3, WT, SEQ ID NO: 26, la Tabla 8) la mutación de la porción de bucle de la estructura de tallo-bucle a una secuencia que consiste de 5' a 3' UUUCGAG (véase, por ejemplo, mutante 8, SEQ ID NO: 36, y la FIG. 3). también resultó en la pérdida de la unión y la internalización en comparación con la del iNA de tipo salvaje (E3-45; FIG. 3, WT, SEQ ID NO: 26, Tabla 8). La falta de unión y la internalización por mutante 8 es evidencia de que el iNA de la invención, que tiene al menos un motivo conservado que tiene una secuencia de nucleótidos de al menos bases contiguas UUUCGG que aparece en al menos una porción de bucle de una estructura de tallo-bucle, es funcionalmente y químicamente (como por secuencia de nucleótidos) diferente de un aptámero descrito por Jeong et al. (Biochem Biophys Res Commun 281: 237-243, 2001) que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 37 y que contiene un UUUCGA en una parte de bucle de una estructura tallo-bucle. Por algoritmos de plegamiento de ARN, el aptámero que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 37 contiene una secuencia UUUCG en una parte de bucle terminal (contiguo o en contacto con sólo una parte de tallo) de la estructura de tallo-bucle del aptámero, a diferencia de tener al menos un motivo conservado que comprende UUUCGG en al menos una porción de bucle que comprende una porción de bucle interno (contiguo o en contacto por dos porciones del tallo) de una estructura tallo-bucle demostrada por un iNA (por sí mismo o que contiene al menos una modificación) de la invención (véase, por ejemplo, las FIGs. 1A y 1B); demostrando por lo tanto también una diferencia estructural en comparación.

20 EJEMPLO 5

[0065] En este Ejemplo, se ilustra la capacidad de un iNA de la invención para unirse e internalizar en líneas celulares de cáncer de próstata humano que representan diferentes etapas de la malignidad en el cáncer de próstata humano, y, sorprendentemente, para unirse e internalizar en las células cancerosas humanas representativas de diversos tipos de tumores malignos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, leucemia mielógena crónica, linfoma de células B, el glioblastoma multiforme, el carcinoma epidermoide, pero no de forma detectable a las células humanas de tejido normal (no maligno) ensayadas. Usando los procedimientos esencialmente como se describe en este documento en Ejemplos 1 y 2, se utilizó un ensayo de selección basado en la citometría de flujo para la internalización para determinar la capacidad de un iNA de la invención de internalizar en las células de varios tipos de tumores malignos, así como en células aisladas de tejido sano humano (no maligno). Se muestra en la Tabla 9 los resultados de los análisis por citometría de flujo en la que se midió y se cuantificó la capacidad del iNA para internalizar en células de diversos tejidos malignos o no malignos. Se midió la intensidad de fluorescencia media para cada tipo de célula en contacto con el iNA pertinente (por ejemplo, D11 o E3). El aumento en veces (determinado mediante la división de la intensidad de fluorescencia media de un tipo de célula usando el iNA relevante por la intensidad media de fluorescencia de las células no teñidas) es un indicador de la capacidad (o incapacidad) de un iNA de la invención para internalizarse en tales células (Tabla 9; "aumento de veces"). Un control de ensayo, no conocido para tener actividad de las células de unión específica e internalización ("control negativo), también se demostró en algunos casos (Tabla 9, "NC"). Este control negativo puede ser usado para representar la unión no específica y/o internalización (por ejemplo, a través de un mecanismo tal como pinocitosis) de una molécula de ácido nucleico a un tipo celular.

45

50

55

60

65

Tabla 9- Enlace e internalización de iNAs para otras células

		D11	E3	NC
5	Tipo de células y derivación	Aumento de veces	Aumento de veces	Aumento de veces
	maligno			
	K562 Leucemia mielógena crónica humana	19,0	23,2	2,1
10	A431 Carcinoma epidermoide humano		6,9	2,5
	PC3 Lesión ósea metastásica de adenocarcinoma de próstata humana	5,8	9,4	1,6
15	DU145 Cáncer de próstata humano metastásico		6,1	1,9
	22Rv1 Xenoinjertos de próstata humano en ratones		14,8	2,8
20	LNCaP Lesión metastásica de ganglio linfático de adenocarcinoma de próstata humana		6,1	2,4
	A549 Adenocarcinoma de pulmón humano	3,2	3,7	1,7
25	MCF7 Adenocarcinoma de mama humano	11,7	31,0	3,0
	T47D Línea celular de tumor epitelial ductal de mama humano		25,8	1,9
30	SKBR3 Adenocarcinoma de mama humano		14,3	1,6
	HCC1937 Carcinoma de mama humano, triple negativo, primario		11,8	2,2
35	HS578T Carcinoma humano, triple negativo, mama altamente metastásico		9,8	3,5
	HCC1143 Carcinoma de mama triple negativo humana		2,1	9,0
40	Células transformadas			
	WIL-2 Línea celular linfoblastoide B transformada con el virus de Epstein Barr, de anemia hereditaria humana esferocítica	11,4	20,6	2,6
45	No maligno			
	PrEC Células epiteliales de la próstata humana primaria	2,7	2,6	2,8
	PBMC (no estim) Células mononucleares de sangre periférica no estimuladas humanas		2,4	2,1
50	Células epiteliales mamarias humanas primarias		5,7	4,8

Además se ilustra, en este ejemplo, un método para suministrar específicamente un resto efector en las células cancerosas, que comprende las etapas de poner en contacto las células cancerosas con un iNA que está acoplado a un resto efector, en donde el iNA se une específicamente a una molécula de la superficie celular para que el iNA ha especificidad, en el que el resto efector es administrado en las células cancerosas, y la administración mínima (poco o no) de unión en las células no malignas ensayadas. La detección mínima o administración mínima en células distintas de las células diana se pueden evidenciar, por ejemplo, por al menos un aumento de dos veces (y un aumento de diez veces o más, en función de las células y los parámetros de actividad medidos) de detección o la administración en las células diana (por ejemplo, células cancerosas) contactadas por un iNA modificado de la invención en comparación con la detección o la administración en o a células distintas de las células diana (por ejemplo, células no malignas) en contacto con un iNA modificado de la invención.

65

EJEMPLO 6

[0066] En este Ejemplo, se ilustran: (a) la modificación de un iNA con un resto efector (además de las ilustraciones de los Ejemplos 2-5 en el presente documento);

(b) modificación de un iNA con una molécula efectora que comprende un fármaco, en la formación de un conjugado de fármaco iNA;

5 (c) una demostración de que el iNA modificado que comprende un conjugado de fármaco iNA puede unirse a e internalizar en las células diana que comprenden las células de cáncer;

(d) una demostración de la especificidad para un conjugado de fármaco iNA para células diana que comprenden las células de cáncer, mientras que se muestra poca o ninguna actividad detectable en las células de tejido normal (no malignas) ensayadas;

10 (e) un conjugado de fármaco específico de tumores que comprende una molécula de ácido nucleico de internalización modificada con un enlazador y un fármaco citotóxico (con el enlazador que tiene una primera porción a la que está acoplada el iNA, y una segunda porción a la que se acopla el fármaco citotóxico);

(f) un método para suministrar al menos un resto efector en las células diana, el método comprende poner en contacto las células diana con un iNA modificado con un enlazador y al menos un resto efector, en el que el resto efector se administra en el citoplasma de las células diana; y (g) un método para tratar, prevenir y/o mejorar una enfermedad o afección asociada con la expresión en células diana de una molécula de superficie para la cual el iNA tiene especificidad de unión, comprendiendo el método poner en contacto un iNA (iNA-ligador-fármaco modificado conjugado) con las células diana, en las que el iNA modificado se administra en una cantidad eficaz para provocar la citotoxicidad de las células diana.

20 **[0067]** En este ejemplo de la invención, un iNA se modificó para comprender un enlazador escindible y un fármaco citotóxico, en la formación de un conjugado de fármaco iNA que podría ser escindido dentro de una célula diana para liberar el fármaco citotóxico, que luego permite que el medicamento induzca la citotoxicidad en las células diana que han internalizado el conjugado fármaco iNA. Para ilustrar este aspecto, un iNA de la invención (E3) se transcribió con una extensión 3' o cola (CACGAGAGGUCCUCCGGAAGC; SEQ ID NO: 40) hibridizable con un oligonucleótido de ácido nucleico modificado para contener un grupo tiol en el extremo 5' ([Thiss][Sp-C₁₈]-GCT-TCCGGAGGACCTCTCGTG; SEQ ID NO: 41; Sp-C₁₈ es un enlazador PEG comercialmente disponible de 18 átomos utilizados como un espaciador colocado entre el tiol y el nucleótido 5' del oligonucleótido). El medicamento que se usa para modificar el iNA comprende una exotoxina de *Pseudomonas* que (i) se ha modificado para reducir la inmunogenicidad, (ii) se sabe que tiene la capacidad de escapar endosomas, ya que contiene una secuencia determinada de aminoácidos (que comprende REDL (SEQ ID NO: 42) o KDEL (SEQ ID NO: 43) que se utiliza en un mecanismo de transporte endosomal ("dominio de translocación"), y (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 44. Tenga en cuenta, y como se muestra por la SEQ ID NO: 44, que la toxina se sintetizó para contener múltiples residuos de lisina (por ejemplo, 4) en el extremo N-terminal de la toxina.

35 **[0068]** El residuo de lisina N-terminal de la toxina fue entonces modificado para incluir un resto reactivo para la formación de un enlazador. En este sentido, se utilizó succinimidilo-4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) como un agente de reticulación. SMCC contiene un N-hidroxisuccinimida reactivo con amina (éster NHS) y un grupo maleimida sulfhidrilo reactivo, en el que los ésteres de NHS reaccionan con aminas primarias a un pH de 7-9 para formar enlaces amida estables; y en el que la maleimida (resto reactivo) puede reaccionar con grupos sulfhidrilo a un pH de 6.5 - 7,5 para formar enlaces tioéter. Para modificar la toxina de incluir el resto reactivo, se hizo reaccionar el éster de NHS de SMCC con residuos de lisina en las moléculas de toxina, convirtiéndolos a maleimidias reactivas, por reacción de la toxina con sulfo-SMCC en PBS/EDTA durante 1 hora a temperatura ambiente. La toxina activada por sulfo-SMCC se desaló por filtración en gel en un tampón de borato, pH 8,5, que contiene NaCl 150 mM, y después se concentró en una unidad de filtración, con un corte de tamaño de 10 kDa, por centrifugación. La toxina activada por sulfo-SMCC se mezcló con el oligonucleótido modificado con tiol reducido (SEQ ID NO: 41) y se incubó durante la noche a 4°C. El conjugado de oligonucleótido-toxina se purificó luego por cromatografía de intercambio aniónico, y se purificó luego adicionalmente por filtración en gel utilizando cromatografía en columna. A continuación, el conjugado de toxina de oligonucleótido purificado se esterilizó por filtración, y se concentró usando un dispositivo de centrifuga para concentrarse. iNA modificado, que comprende un conjugado de fármaco iNA, se formó mediante la mezcla del iNA que contiene la cola para la hibridación (SEQ ID NO: 45) con el conjugado de toxina de oligonucleótido purificado en una proporción de 1: 1, y lo que permite la hibridación (entre la cola y oligonucleótido) a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Si se desea, el conjugado de fármaco iNA se puede purificar adicionalmente usando una cualquiera o más técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía de intercambio aniónico. En esta ilustración, el enlazador compone la cola de ácido nucleico, sintetizado como parte del iNA, hibridado con el oligonucleótido, que se acopló a la toxina.

60 **[0069]** El iNA modificado se evaluó luego para la administración de la droga a las células diana, en comparación con las células sanas o normales (no malignas) para las que un iNA de la invención ha demostrado que carece de actividad de unión y la internalización detectable (véase, por ejemplo, la Tabla 8). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos el día, antes de la exposición al conjugado de toxina iNA, a una concentración determinada para cada línea celular a ser óptima para el crecimiento logarítmico durante el curso del experimento. Las diluciones en serie de los conjugados de fármaco iNA, o homólogos de sólo toxina, se aplicaron a las células por duplicado o triplicado y se incubaron durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Después de 72 horas se añadió un colorante (Cell Titer azul (Promega)) a cada pocillo, y después se incubó durante 3 horas a 37°C, 5% CO₂, para evaluar la actividad metabólica de las células. El uso de pocillos no tratados de células como control, la actividad metabólica se

representó frente a la concentración del conjugado fármaco iNA, y se determinó la concentración del conjugado de fármaco de iNA, donde la actividad metabólica se reduce a la mitad (CI₅₀) para cada línea celular (véase Tabla 10).

Tabla 10

Células	Toxina	E3-Toxina
	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)
maligno		
PC3	>100	1,1
LNCaP	>100	0,4
MCF7	>100	0,07
T47D	>100	0,7
SKBR3	>100	0,04
HCC1937	>100	0,06
HS578T	>100	2,0
HCC1143	>100	0,02
no maligno		
PrEC Células epiteliales de próstata primarias humanas	>100	>100

[0070] Los resultados de la Tabla 10 muestran que un conjugado de fármaco iNA de la invención puede administrar un fármaco citotóxico funcional en células tumorales con alta potencia (por ejemplo, una CI₅₀ de 2 nM o menos), incluso en tumores de diferentes tipos, y con una alta especificidad (por ejemplo, con un efecto mínimo o ningún efecto citotóxico detectable en las células no malignas, tales como células epiteliales de próstata primarias).

[0071] La descripción anterior de las realizaciones específicas de la presente invención se han descrito en detalle para fines de ilustración.

LISTADO DE SECUENCIA

[0072]

<110> b3 bio

<120> Composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico internalizante y sus métodos de uso

<130> b3bio101

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintetizado

<400> 1

Gly Pro Pro Gly Pro
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado
 5
 <400> 2

10
 Gly Glu Ala Gly Pro
 1 5

15
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> sintetizado
 <400> 3
 25

Gly Glu Thr Gly Pro
 1 5

30
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> sintetizado
 <400> 4
 40

Gly Glu Ser Gly Pro
 1 5

45
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> sintetizado
 <400> 5
 55

Gly Asp Thr Gly Pro
 1 5

60
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 65

ES 2 655 197 T3

<220>
<223> sintetizado
<400> 6

5 Gly Asp Ser Gly Pro
1 5

10 <210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
15 <220>
<223> sintetizado
<400> 7

20 Pro Pro Gly Pro
1

25
30 <210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
35 <220>
<223> sintetizado
<400> 8

40 Gly Phe Leu Gly
1

45 <210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
50 <220>
<223> sintetizado
<400> 9

55 Gly Phe Gln Gly Val Gln Phe Ala Gly Phe
1 5 10

60 <210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

65

ES 2 655 197 T3

<220>
 <223> sintetizado

 <400> 10
 5

 Gly Phe Gly Ser Val Gln Phe Ala Gly Phe
 1 5 10

 10

 <210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> sintetizado

 20 <400> 11

 Ala Leu Ala Leu
 1

 25 <210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> sintetizado

 <400> 12

 35 Arg Val Arg Arg
 1

 40 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> sintetizado

 <400> 13

 50 Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly
 1 5 10

 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> sintetizado

 60 <400> 14

 Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
 1 5 10

 65

ES 2 655 197 T3

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> sintetizado
 <400> 15
 10
 Ser Asn Ser Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro
 1 5 10
 15
 <210> 16
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> sintetizado; doble hebra
 <400> 16
 25 agagga 6
 <210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> sintetizado
 35 <400> 17
 ataatccacc tatcccagta ggagaaat 28
 <210> 18
 <211> 60
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado
 45 <400> 18
 tttggtcctt gtcttatgtc cagaatgcta atacgactca ctatagggag gacgatgagg 60
 <210> 19
 <211> 40
 <212> RNA
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> sintetizado
 55 <400> 19
 uacuuucggg cuuucggcaa caucagcccc ucaggacgca
 60 <210> 20
 <211> 40
 <212> RNA
 <213> Artificial
 65

ES 2 655 197 T3

<220>
<223> sintetizado

<400> 20
5 uccccggauu ucggauacga uccucaucc cuugaccgca

<210> 21
<211> 83
<212> ARN
10 <213> Artificial

<220>
<223> sintetizado

15 <220>
<221> misc_ARN
<222> (16)..(55)

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (16)..(55)
<223> n is a, c, g, or u

<400> 21
25

 gggaggacga ugccggnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnauuuc
 uccuacuggg auagguggau uau

30 <210> 22
<211> 13
<212> ARN
<213> Artificial

35 <220>
<223> sintetizado

40 <220>
<221> misc_ARN
<222> (7)..(7)
<223> N puede ser cualquiera de A, U, G, C ; y el número de N es uno de 4.

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n es a, c, g, or u

<400> 22
50 uuucggnuuu cgg 13

<210> 23
<211> 21
<212> ARN
55 <213> Artificial

<220>
<223> sintetizado

60 <400> 23
cacgagaggu ccuccggaag c

<210> 24
<211> 21
65 <212> ADN

ES 2 655 197 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado
 5 <400> 24
 gcttccggag gacctctcgt g
 <210> 25
 10 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> sintetizado
 <220>
 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(62)
 20 <400> 25
 <210> 26
 <211> 46
 <212> ARN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado
 30 <210> 26
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado
 35 <220>
 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)
 <400> 26
 40 gggugcggua cuucgggcu uucggcaaca ucagcccuc aggacg 46
 <210> 27
 <211> 32
 <212> ARN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado
 50 <220>
 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(32)
 <400> 27
 55 gggaggcuuu cgggcuucg gcaacaucag cc 32
 <210> 28
 <211> 22
 <212> ARN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado
 65 <220>

<221> tallo_bucle
 <222> (1)..(22)
 <400> 28
 gggaggcugg gcuucggca ac 22
 5
 <210> 29
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> sintetizado
 <220>
 15 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)
 <400> 29
 gggugcgaaa cuuucgggcu uucggcaaca ucagcccuc agaccg 46
 20
 <210> 30
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> sintetizado
 <220>
 30 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)
 <400> 30
 gggugcggua cuaaagggcu uucggcaaca ucagccaaa aggacg 46
 35
 <210> 31
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> sintetizado
 <220>
 45 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)
 <400> 31
 gggugcggua cuuucgggcu aaaggcaaca ucagcccuc aggacg 46
 50
 <210> 32
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> sintetizado
 <220>
 60 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)
 <400> 32
 gggugcggua cuuucgggcu uucaaaaaca ucagcccuc aggacg 46
 65

<210> 33
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> sintetizado

 <220>
 10 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)

 <400> 33
 15 gggugcggua cuuucgggcu uucggcuua ucagccccuc aggacg 46

 <210> 34
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> sintetizado

 <220>
 25 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)

 <400> 34
 30 gggugcggua cuuucgggcu uucggccca ucagccccuc aggacg 46

 <210> 35
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> sintetizado

 <220>
 40 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)

 <400> 35
 45 gggugcggua cuuucgggcu uucggcaacu auagccccuc aggacg 46

 <210> 36
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> sintetizado

 <220>
 55 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(46)

 <400> 36
 60 gggugcggua cuuucgggcu ggcacuuucg aaagccccuc aggacg 46

 <210> 37
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65

ES 2 655 197 T3

<220>
<223> sintetizado
<220>
<221> tallo_bucle
5 <222> (1)..(70)

<400> 37

10 aagguaacucu gugcuugucg augugyauug auggcacuuu cgagucaacg aguugacagg
acaaguaguc

<210> 38
15 <211> 83
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
20 <223> sintetizado

<220>
<221> tallo_bucle
<222> (1)..(83)
25 <400> 38

30 gggaggacga ugcggucucc ggauuucgga uacgauccu caucccuuga ccgcauuuc
uccuacuggg auagguggau uau

<210> 39
<211> 83
<212> ARN
35 <213> Artificial

<220>
<223> sintetizado

40 <220>
<221> tallo_bucle
<222> (1)..(83)

<400> 39
45 gggaggacga ugcgguacuu ucgggcuuuc ggcaacauca gccccucagg acgcauuuc
uccuacuggg auagguggau uau

50 <210> 40
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial
55 <220>
<223> sintetizado

<400> 40
60 cacgagaggu ccuccggaag c

<210> 41
<211> 21
<212> ADN
65 <213> Artificial

ES 2 655 197 T3

<220>
 <223> sintetizado
 <400> 41
 gcttccggag gacctctgt g
 5
 <210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> sintetizado
 <400> 42
 15
 Arg Glu Asp Leu
 1
 20
 <210> 43
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> sintetizado
 <400> 43
 30
 Lys Asp Glu Leu
 1
 35
 <210> 44
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> sintetizado
 <400> 44
 45
 Met Lys Lys Lys Lys His His His His His His Ala Ser Gly Gly Arg
 1 5 10 15
 50
 His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu Phe
 20 25 30
 55
 Leu Gly Asp Gly Gly Ala Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
 35 40 45
 60
 Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Gly
 50 55 60

ES 2 655 197 T3

Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
 65 70 75 80
 5 Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
 85 90 95
 10 Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 100 105 110
 15 Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala Gly Arg Ile Arg Asn Gly
 115 120 125
 20 Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 130 135 140
 25 Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
 145 150 155 160
 30 Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
 165 170 175
 35 Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
 180 185 190
 40 Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
 195 200 205
 45 Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Ser Glu Ala
 210 215 220
 50 Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Asp Leu Lys
 245

<210> 45
 <211> 104
 55 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado
 60 <220>
 <221> tallo_bucle
 <222> (1)..(104)
 65 <400> 45

ES 2 655 197 T3

5 gggaggacga ugcgguacuu ucgggcuuuc ggcaacauca gcccucagg acgcauuuc 60
 uccuacuggg auagguggau uaucacgaga gguccuccgg aagc 104

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una molécula de ácido nucleico de internalización ("iNA") modificado para incluir al menos un resto efector, en donde al menos un resto efector comprende uno o más de un fármaco o resto detectable o combinación de los mismos, en el que el iNA:
- 10 a. comprende un ARN que se une a una molécula de superficie celular en las células tumorales y en el que la molécula de superficie celular es distinto de antígeno de membrana específico de la próstata;
- 15 b. es capaz de unión e internalización en más de un tipo de célula tumoral; y
- c. comprende ARN de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos que tienen una estructura de tallo-bucle, según lo predicho por un algoritmo de plegamiento de ARN, en el que la estructura de tallo-bucle comprende al menos dos partes de bucle, en el que al menos dos partes de bucle de la estructura de tallo-bucle comprenden una secuencia de ácido nucleico que contiene un motivo de nucleótidos contiguos de UUUCGG; y en el que el iNA modificado se internaliza en las células diana, en administrar la fracción de al menos un efector en las células diana;
- para su uso en la administración de al menos un resto efector en las células diana.
- 20 **2.** iNA para su uso según la reivindicación 1, en el que el iNA se modifica para incluir al menos una modificación química, en el que la modificación por lo menos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico del iNA, la incorporación de un nucleótido modificado en el iNA, la conjugación a un enlazador, y la conjugación con al menos un resto efector comprende uno o más de un fármaco o un resto detectable o una combinación de los mismos.
- 25 **3.** Una molécula de ácido nucleico de internalización modificado, en el que la molécula de ácido nucleico de internalización ("iNA"):
- 30 (a) comprende ARN de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos y que tiene una estructura de tallo-bucle que contiene al menos una porción de bucle; donde la porción de al menos un bucle comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene al menos un motivo conservado seleccionado de UUUCGG, UUUCGGGC, o $(UUUCGG)_m(UUUCGG)_n$ (SEQ ID NO: 22), o una combinación de los mismos; en la que n es un número de uno a cuatro, N es un nucleótido, m es un número de 0 a 4;
- 35 (b) es capaz de unirse a una molécula de superficie celular en las células tumorales, en la que la molécula de superficie celular es distinto de antígeno de membrana específico de la próstata; y
- (c) se modifica para incluir al menos una modificación química, en la que la modificación por lo menos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico del iNA, la incorporación de un nucleótido modificado en el iNA, la conjugación a un enlazador, y la conjugación con al menos un resto efector comprende uno o más de un fármaco o resto detectable o combinación de los mismos; y
- 40 (d) iNA modificado es capaz de internalizarse en las células tumorales.
- 45 **4.** Una molécula de ácido nucleico de internalización ("iNA") que comprende ARN de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos y que tiene una estructura de tallo-bucle, como se predijo por un algoritmo de plegado ARN, en el que la estructura de tallo-bucle comprende al menos dos porciones de bucle, donde cada una de las al menos dos partes de bucle de la estructura de tallo-bucle comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene un motivo de nucleótidos contiguos de UUUCGG.
- 50 **5.** iNA de la reivindicación 4, en el que el iNA se modifica adicionalmente para incluir al menos una modificación química, en la que la modificación por lo menos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico del iNA, la incorporación de un nucleótido modificado en el iNA, la conjugación a un enlazador, y la conjugación con al menos un resto efector comprende uno o más de un fármaco o un resto detectable o una combinación de los mismos.
- 55 **6.** iNA de la reivindicación 4, en el que el iNA comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, o SEQ ID NO: 29.
- 60 **7.** El iNA de la reivindicación 4, en el que el iNA comprende una molécula de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, o SEQ ID NO: 29; y contiene un motivo de nucleótidos contiguos de UUUCGG.
- 65 **8.** iNA de la reivindicación 4, en el que el iNA tiene un motivo de $(UUUCGG)_m(UUUCGG)_n$ (SEQ ID NO: 22); en la que n es un número de uno a cuatro, N es un nucleótido, m es un número de 0 a 4,
- 9.** Una molécula de ácido nucleico de internalización de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento o el diagnóstico o el tratamiento y diagnóstico de una enfermedad seleccionada de uno o más de cáncer, condición precancerosa, un trastorno de proliferación celular, y un trastorno de las células de diferenciación.

10. Una molécula de ácido nucleico de internalización de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento o el diagnóstico o el tratamiento y diagnóstico de una enfermedad seleccionada de uno o más de cáncer, condición precancerosa, un trastorno de proliferación celular, y un trastorno de las células de diferenciación.

5 **11.** Una molécula de ácido nucleico de internalización de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en el tratamiento o el diagnóstico o el tratamiento y diagnóstico de una enfermedad seleccionada de uno o más de cáncer, condición precancerosa, un trastorno de proliferación celular, y un trastorno de las células de diferenciación.

10 **12.** Una molécula de ácido nucleico de internalización ("iNA") modificado para incluir al menos un resto efector, en donde al menos un resto efector comprende un fármaco citotóxico, en el que el iNA comprende ARN de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos y que tiene una estructura de tallo-bucle, como se predijo por un algoritmo de ARN de plegado, en el que la estructura de bucle-tallo comprende al menos dos partes de bucle, en el que cada una de las al menos dos porciones de bucle comprenden una secuencia de ácido nucleico que contiene un motivo de nucleótidos contiguos de UUUCGG, y en el que el iNA modificado se une a e
15 internaliza en las células cancerosas, para su uso en la causa de la citotoxicidad en células de cáncer.

13. iNA para su uso según la reivindicación 12, en el que el iNA se modifica para incluir al menos una modificación química, en el que la modificación por lo menos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en la secuencia de ácido nucleico del iNA, la incorporación de un nucleótido modificado en el iNA, la conjugación a un
20 enlazador, y la conjugación con al menos un resto efector comprende uno o más de un fármaco o un resto detectable o una combinación de los mismos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

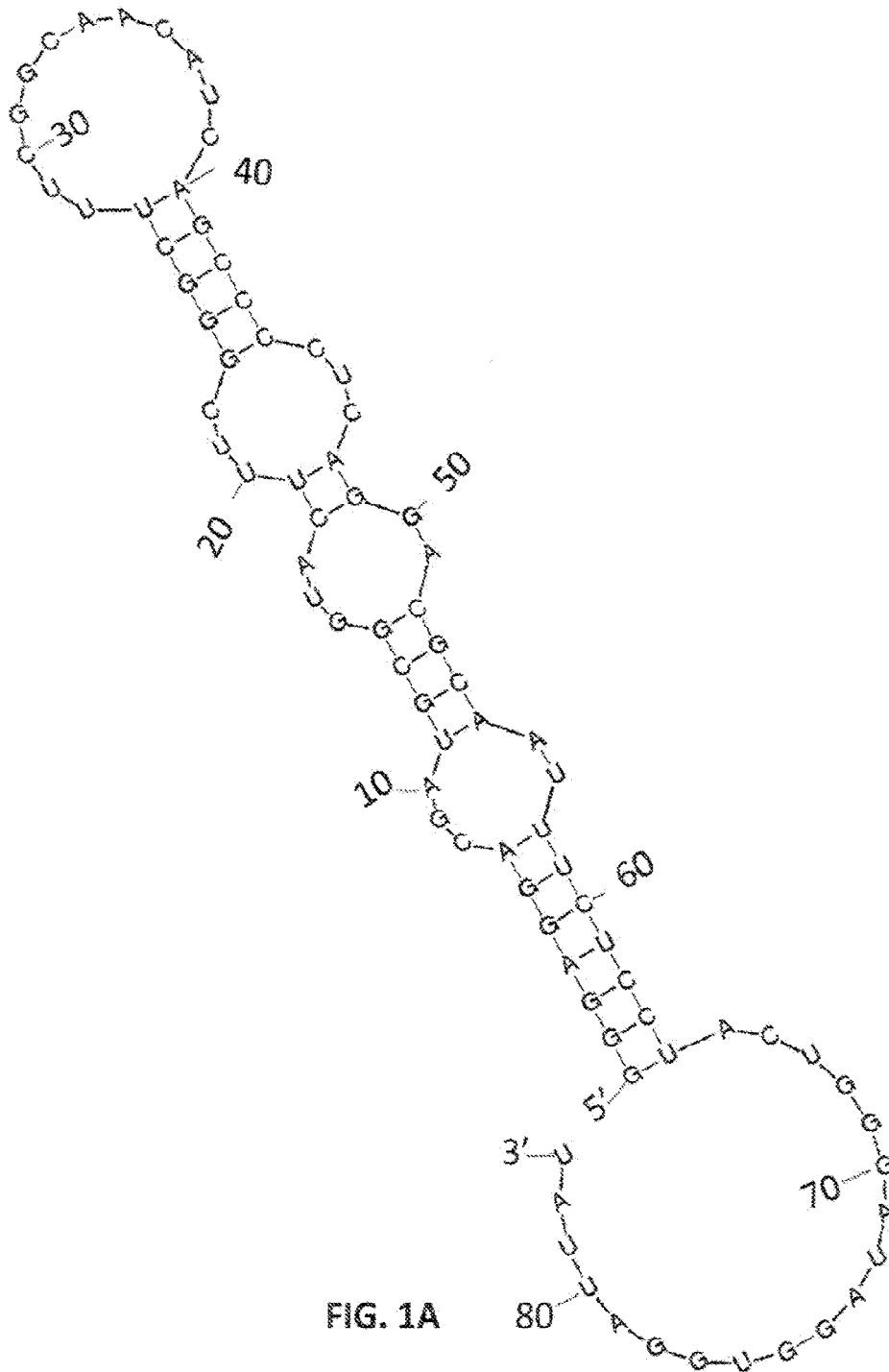


FIG. 1A

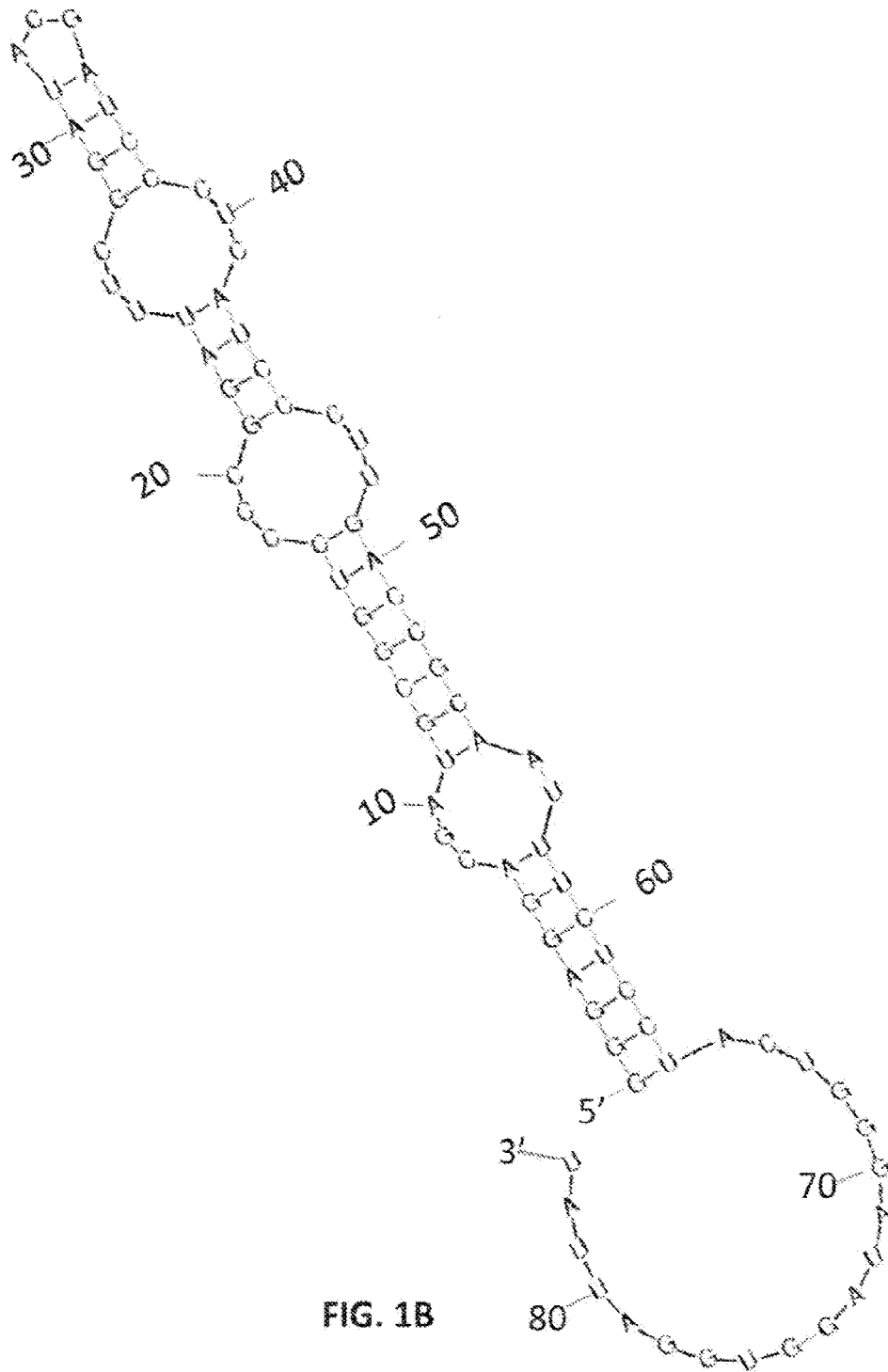
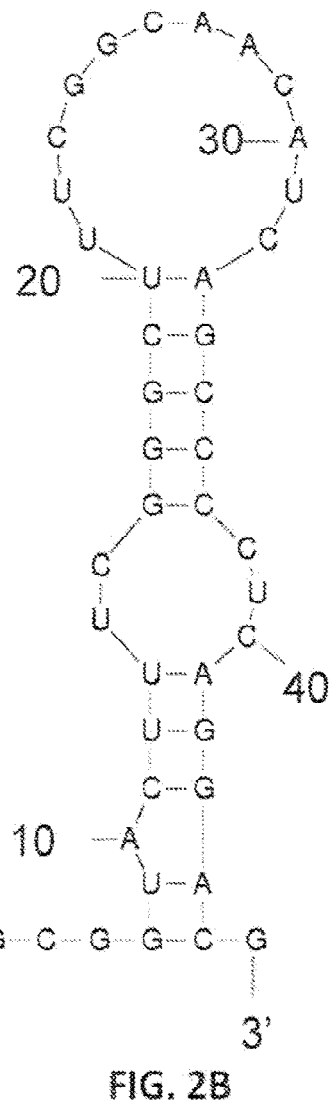
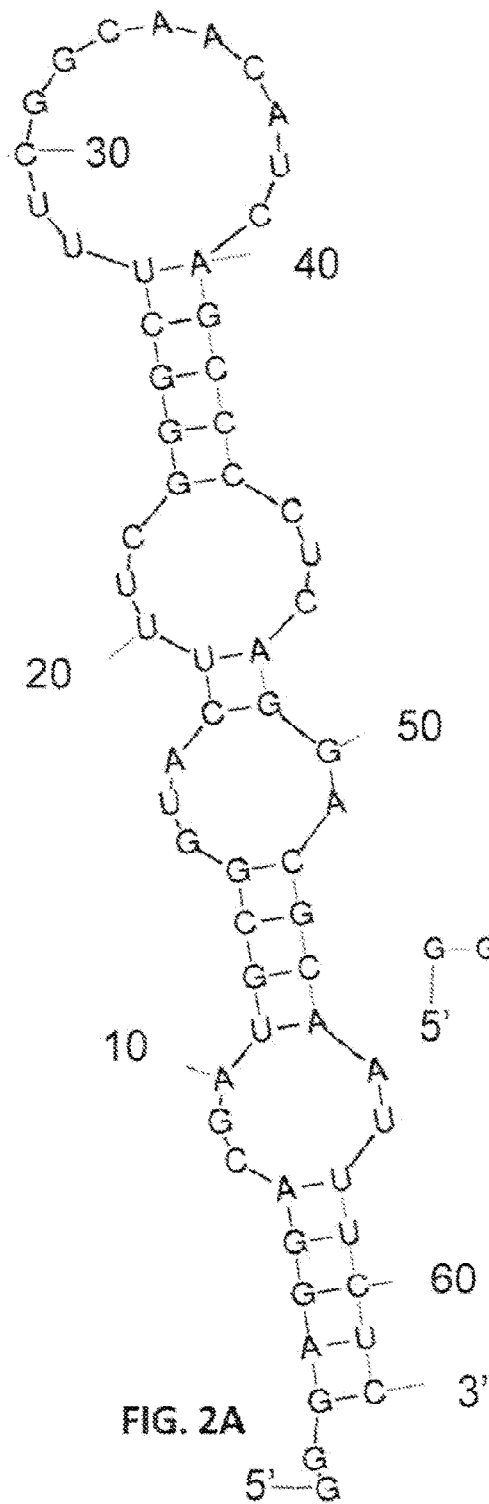


FIG. 1B



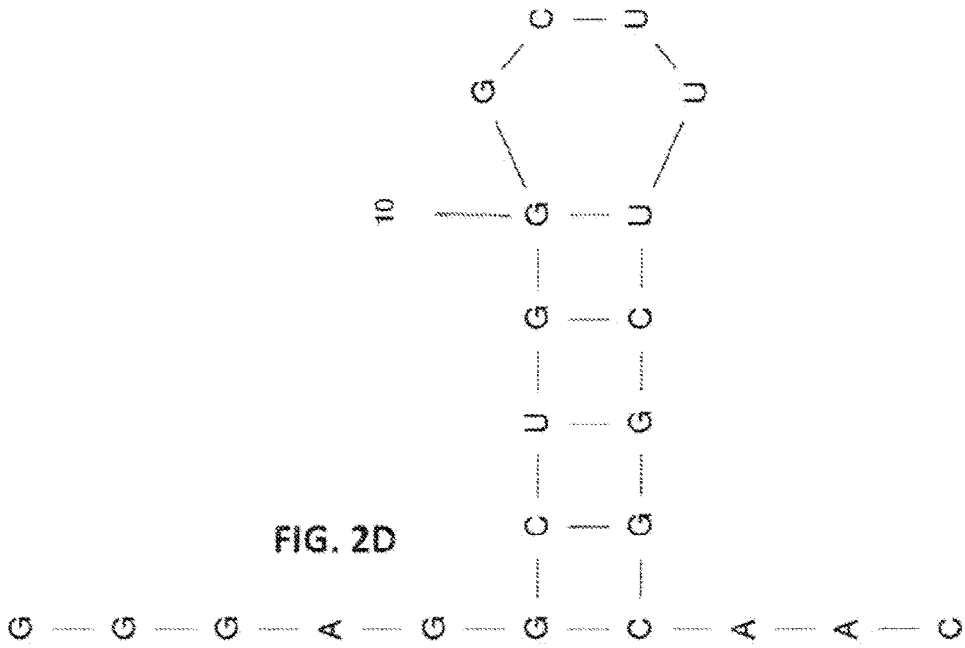
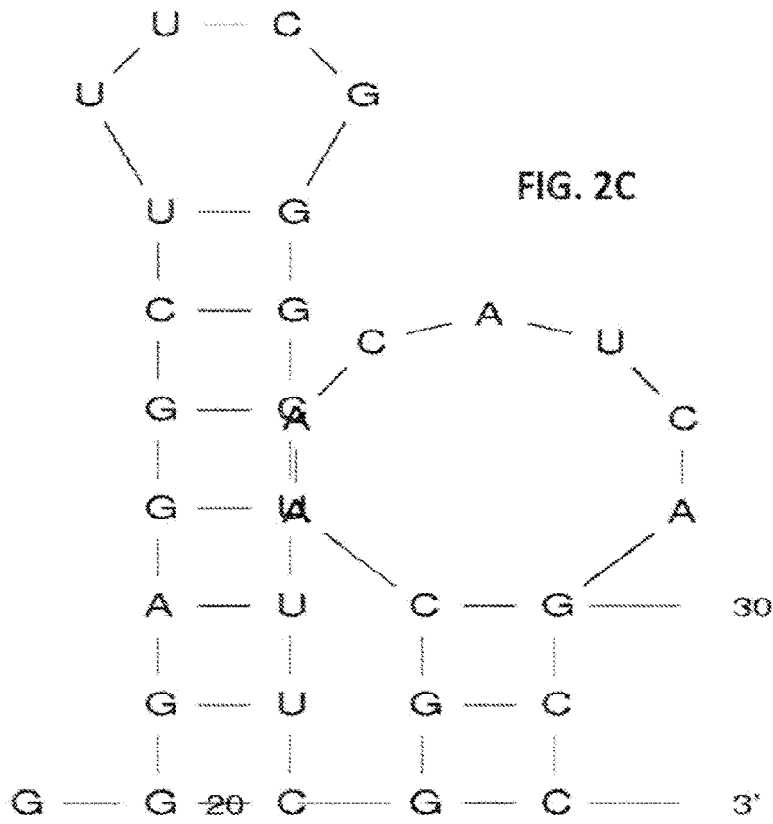


FIG. 3

