

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 129**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2013 PCT/EP2013/073740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2013 E 13789802 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2920306**

54 Título: **Administración de agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

**13.11.2012 SE 1251290**

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

**16.10.2018**

73 Titular/es:

**CODIAK BIOSCIENCES, INC. (100.0%)  
500 Technology Square, 9th Floor  
Cambridge, Massachusetts 02139, US**

72 Inventor/es:

**LÖTVALL, JAN y  
NILSSON, JONAS ANDREJ**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 686 129 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Administración de agentes terapéuticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la administración de agentes potencialmente terapéuticos a través de vesículas derivadas de células.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En 2008, un número de cánceres ya representaban 7,6 millones de muertes (alrededor del 13% de todas las muertes), según la Organización Mundial de la Salud (OMS), y se prevé que este número siga aumentando, con una estimación de 13,1 millones de muertes en todo el mundo en 2030 [GLOBOCAN 2008 (IARC) Sección de información sobre el cáncer (11 de nov. de 2012)].

15 El melanoma maligno es responsable de la mayoría de las muertes causadas por los tumores de la piel y es la neoplasia maligna más común en los adultos jóvenes. Cuando el melanoma es metastásico, el pronóstico es desfavorable y las alternativas terapéuticas son pocas. El melanoma uveal tiene diferentes características clínicas respecto a los melanomas cutáneos y, con frecuencia, se disemina principalmente en el hígado. Para el melanoma uveal se ha propuesto que aproximadamente uno de cada dos pacientes desarrollará metástasis dentro de los 15 años posteriores al tratamiento del tumor ocular primario. El tiempo promedio de supervivencia después del diagnóstico de la metástasis hepática es de 8 a 10 meses y la tasa de mortalidad en pacientes con metástasis hepática de melanoma uveal es del 92% en dos años. Una opción de tratamiento es la perfusión regional del hígado con hipertermia y melfalán. Sin embargo, este enfoque es muy invasivo y se asocia con riesgos de complicaciones quirúrgicas. Aunque se observan remisiones en la mayoría de los casos, la supervivencia solo se prolonga marginalmente.

20 El melanoma de la piel y el melanoma uveal son solo dos ejemplos de cáncer, que se cobra la vida de millones de personas cada año. El tratamiento del cáncer es, por lo tanto, uno de los principales desafíos que enfrenta la medicina moderna.

25 En general, las estrategias terapéuticas contra el cáncer actuales incluyen la cirugía, radioterapia, fármacos citotóxicos (quimioterapia) y medicamentos hormonales. Un inconveniente de los agentes quimioterapéuticos es que no son selectivos y causan efectos secundarios adversos, lo que limita eficazmente la dosificación y, por lo tanto, también el efecto terapéutico. Existe la necesidad de terapias mejoradas y más selectivas contra el cáncer.

30 Un ejemplo raro de un medicamento dirigido directamente a un oncogén de mutación puntual es el vemurafenib, que se dirige específicamente a la mutación BRAF<sup>V600E</sup> común en los melanomas de la piel, con relativamente menos efectos inespecíficos en comparación con la quimioterapia. Sin embargo, este tratamiento solo prolonga la vida algunos meses en el melanoma metastásico y solo funciona en los melanomas que tienen esta mutación específica. Por lo tanto, una posibilidad sería dirigirse a las moléculas de señalización cadena abajo. Los objetivos cadena abajo, sin embargo, carecen de actividad enzimática y, a menudo, son imposibles de tratar con moléculas pequeñas, debido a su estructura terciaria. Además, como un inhibidor de molécula pequeña se distribuiría por todo el cuerpo, también causaría efectos secundarios sistémicos en células sanas normales dependientes de tales moléculas cadena abajo.

35 En la última década, la terapia génica ha recibido una mayor atención y se cree que en el futuro la terapia génica podrá ser aplicable a muchas enfermedades, incluido el cáncer.

40 La forma más común de la terapia genética implica el uso de ADN que codifica un gen funcional y terapéutico para reemplazar un gen mutado. Otros tipos de terapia génica implican la corrección directa de una mutación o el uso de ADN que codifica un fármaco proteico terapéutico (en lugar de un gen humano natural) para proporcionar el tratamiento. También se ha sugerido que puede ser posible explotar el ARN de interferencia, denominado ARNi, en la terapia génica contra, p. ej., infecciones o el cáncer.

45 El ARNi es un mecanismo de regulación de genes que se encuentra en muchas células eucarióticas y que se conoce desde finales de la década de 1990 y que ha sido utilizado principalmente como una herramienta de investigación para lograr la eliminación de genes.

50 Sin embargo, un reto importante para el desarrollo de terapias basadas en ARNi y otras aplicaciones de la terapia génica es la administración del agente terapéutico (por ejemplo, una molécula de ARN). Los vectores virales pueden ser eficientes, pero generan problemas de seguridad y pueden ser eliminados rápidamente por el sistema inmune del paciente; lo que reduce su impacto.

El modo de administración es particularmente importante cuando el objetivo es un gen o un producto génico que es importante para la función también de las células sanas normales. Por lo tanto, administrar un fármaco de manera concentrada a una célula enferma específicamente tiene el potencial de reducir los efectos secundarios sistémicos y

los efectos secundarios en otras células.

Por lo tanto, un obstáculo para la selección exitosa de genes y proteínas involucradas en la enfermedad, incluido el cáncer, es el desarrollo de un método seguro y eficaz para administrar el agente terapéutico al objetivo.

Sumario de la invención

- 5 Un objeto de la invención es superar, al menos parcialmente, los inconvenientes de las tecnologías existentes y proporcionar un medio para suministrar un agente terapéutico; en particular, un oligonucleótido a las células diana.

En un primer aspecto, estos y otros objetos se logran mediante un método in vitro o ex vivo para producir nanovesículas que comprenden un oligonucleótido inhibidor para un oncogén o un protooncogén o el producto génico del mismo, comprendiendo dicho método:

- 10 a) introducir una secuencia de ADN que codifica un ácido nucleico capaz de inhibir un gen MYC o producto genético humano en una célula de mamífero;
- b) transfectar o transducir la célula con una construcción que comprende un gen L-Myc;
- c) mantener la célula en condiciones que permitan la expresión de dicho inhibidor de oligonucleótidos y sobreexpresar L-Myc; y
- 15 d) obtener nanovesículas que contienen dicho inhibidor de oligonucleótidos de dicha célula,

en el que dichas nanovesículas son vesículas derivadas de células que tienen un tamaño de menos de 500 nm.

La etapa de obtención de las nanovesículas puede incluir el aislamiento de vesículas extracelulares liberadas naturalmente del cultivo celular, y/o la producción de nanovesículas por extrusión de la célula a través de los micro-y/o nano-filtros.

- 20 Como se usa en el presente documento, "oncogén" se refiere a un gen que tiene el potencial de causar un cáncer. En las células cancerosas, los oncogenes a menudo se mutan o se expresan en niveles elevados (regulados por incremento o amplificados). Un "proto-oncogén" se refiere a un gen que puede convertirse en un oncogén debido a mutaciones o a una expresión aumentada. Los ejemplos de protooncogenes conocidos incluyen RAS, WNT, MYC, ERK y TRK.

- 25 Tal como se usa en la presente memoria, "nanovesícula" se refiere a una vesícula derivada de una célula que tiene un tamaño en el intervalo de nanómetros y, típicamente, inferior a 500 nm. Las "vesículas derivadas de células" incluyen vesículas extracelulares o exosomas liberados naturalmente de las células, así como vesículas producidas a partir de células por extrusión en serie de las células a través de micro- y/o nano-filtros, como se describe en este documento. Las nanovesículas producidas a partir de células mediante extrusión en serie pueden denominarse
- 30 "nanovesículas artificiales"; sin embargo, debe observarse que "artificial", en este contexto, solo significa que las células liberan las nanovesículas de forma natural (en oposición a, por ejemplo, los exosomas). Por lo tanto, "artificial", en este contexto, no sugiere que las nanovesículas sean sintéticas; son todavía derivadas de células y están constituidas por los mismos componentes que la célula a partir de la cual se originó la nanovesícula ("célula productora").

- 35 Tal como se usa en la presente memoria, "inhibir" significa que la expresión de un gen que da como resultado un producto génico funcional (por ejemplo, una proteína) se reduce, p. ej., por inhibición de la transcripción, degradación del ARNm o inhibición de la traducción del ARNm a la proteína. En el contexto de la presente invención, la "inhibición" no necesita ser completa la inhibición o represión parcial o la regulación negativa también pueden proporcionar un efecto deseable.

- 40 Como se usa en el presente documento, "inhibidor de oligonucleótidos" se refiere a un oligonucleótido que es un inhibidor; es decir, es capaz de inhibir una molécula diana. También se puede denominar "inhibidor de oligonucleótidos".

- El método de la presente invención es ventajoso; en particular, en comparación con el uso de vehículos de administración sintéticos tales como los liposomas sintéticos, ya que la producción de nanovesículas puede
- 45 ampliarse fácilmente cultivando más células productoras de nanovesículas, y las nanovesículas podrían producirse en grandes cantidades en un punto de tiempo adecuado; por ejemplo, cuando la célula esté expresando niveles óptimos de la molécula diana. Adicionalmente, las nanovesículas obtenidas mediante la presente invención; en particular las nanovesículas, obtenidas por extrusión en serie de las células productoras, pueden contener concentraciones más altas del oligonucleótido inhibidor (mayor capacidad de carga) y pueden ser más fáciles de
- 50 cargar con un oligonucleótido inhibidor tal como ARNpiwi. Además, varias modificaciones de las nanovesículas, p. ej., mediante la expresión de moléculas diana en la superficie, se habilitan o al menos se simplifican enormemente. El método de la invención también es rentable, ya que un cultivo de células productoras de nanovesículas se puede ampliar mediante un cultivo celular normal, y también ser congelado; lo que reduce los residuos asociados con la vida útil de las células. El oligonucleótido inhibidor es un inhibidor de un gen humano MYC o producto génico,

preferiblemente el gen c-Myc o el producto génico.

5 En realizaciones de la invención, el oligonucleótido puede ser ARN, preferiblemente una molécula de ARNi. Una molécula de ARNi puede seleccionarse del grupo que consiste en ARNhc, ARNip, ARNmi, ARNpiwi o RNA antisentido, o cualquier otra molécula con capacidad de ARNi. La secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido capaz de inhibir un oncogén humano o un protooncogén puede ser una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-32, y SEQ ID NO: 185-218, más preferiblemente seleccionada entre SEQ ID NO: 1-9 y SEQ ID NO: 185-196.

En realizaciones de la invención, la célula puede expresar una molécula diana en la superficie de la célula.

10 Tal como se usa en el presente documento, "molécula diana" significa una molécula capaz de unirse específicamente a otra molécula ("molécula diana"). Por lo tanto, una molécula diana puede usarse para localizar específicamente, p. ej. una célula o vesícula que presenta la molécula diana en su superficie a una entidad, tal como una célula cancerosa, que presenta la molécula diana.

15 La molécula diana puede ser un ligando que se une específicamente a una proteína de superficie que se sobreexpresa en células cancerosas. La expresión de las moléculas diana de superficie en las células productoras de nanovesículas puede proporcionar un objetivo específico de tejido de las nanovesículas obtenidas de las células. Una ventaja de hacer que la célula productora exprese la molécula diana es que la célula crea una molécula unida a la membrana que puede ser más eficiente interactuando con receptores diana, mientras que la eficacia de la diana modificada por el liposoma a menudo puede fallar.

20 Opcionalmente, el método puede comprender introducir una secuencia de ADN que codifica una molécula diana para que se exprese en la superficie de la célula, antes de la etapa a) o simultáneamente con la etapa a).

En realizaciones de la invención, la célula puede expresar al menos dos moléculas diana diferentes, que pueden aumentar adicionalmente la especificidad del reconocimiento o mejorar de otro modo el reconocimiento de las células y/o las nanovesículas frente a las células cancerosas.

25 Los ejemplos de moléculas diana adecuadas incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la hormona estimulante de melanocitos (MSH) o una región variable de un anticuerpo dirigido contra una proteína de superficie que se sobreexpresa en células cancerosas, o un fragmento fab de dicho anticuerpo.

30 En realizaciones de la invención, la célula es una célula humana y el oncogén o protooncogén es un oncogén o protooncogén humano. En dichas realizaciones, la célula humana puede transfectarse o transducirse con una construcción genética que comprende un gen cuyo producto génico reemplaza funcionalmente al oncogén humano o protooncogén expresado naturalmente por la célula humana. Por ejemplo, el oncogén humano o protooncogén puede ser un miembro de la familia de genes MYC, y la construcción genética puede comprender otro miembro de la familia de genes MYC.

35 En realizaciones de la invención, la etapa a) del método anterior puede comprender introducir una construcción genética que comprenda dicha secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido capaz de inhibir c-Myc humano, operativamente unida a un promotor inducible, y la etapa b) puede comprender la expresión inductora por activación de dicho promotor inducible.

El método para producir nanovesículas de acuerdo con la invención se puede realizar in vitro o ex vivo.

También se describe en este documento una nanovesícula aislada producida por el método descrito anteriormente.

40 Como se usa en este documento, "nanovesícula aislada" se refiere a una nanovesícula que se ha separado al menos de la célula productora, típicamente separada del cultivo de células productoras o de un primer filtrado obtenido al producir nanovesículas artificiales mediante extrusión en serie a través de micro- o nano-filtros, como se describe más abajo. Las nanovesículas aisladas típicamente están contenidas en un medio o composición, y pueden haber sido sometidas a una o más etapas de aislamiento o purificación para eliminar, p. ej., restos celulares u otros componentes que se originan en las células; por ejemplo, mediante centrifugación y/o filtración.

45 Aunque la presente memoria descriptiva dice "una nanovesícula", se entiende que este término también abarca una pluralidad de nanovesículas.

50 La presente descripción también proporciona una nanovesícula aislada que comprende un oligonucleótido inhibidor para un oncogén o protooncogén humano, preferiblemente un factor de transcripción oncogénico o proto-oncogénico humano. En particular, el oncogén o protooncogén puede ser un miembro de la familia de genes MYC, y más preferiblemente el gen que codifica c-Myc humano. Alternativamente, el oncogén o protooncogén puede ser un miembro de la familia de genes E2F y, más preferiblemente, un gen humano que codifica E2f1, E2f2 o E2f3 humano. Como otro ejemplo del oncogén o protooncogén puede haber un miembro de la familia de genes RAS y, más preferiblemente, un gen humano que codifique H-Ras, N-Ras o K-Ras humanos.

En realizaciones, el oligonucleótido inhibidor puede ser ARN, preferiblemente una molécula de ARNi. La molécula de

ARNi puede seleccionarse del grupo que consiste en ARNhc, ARNip, ARNmi, ARNpiwi o ARN antisentido, o cualquier otra molécula con capacidad de ARNi. En algunas realizaciones, el ARN puede ser ARNhc o ARNpiwi que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID N°: 93-184, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID N°: 93-124 (dirigida a myc) y 125-159 (dirigida a E2f), por ejemplo, seleccionado entre SEQ ID NO: 93-102 (dirigida a c-myc).

Sin embargo, el oligonucleótido también puede ser ADN, p. ej. un oligonucleótido antisentido (ASO).

Además, la presente descripción proporciona una célula humana transfectada o transducida con una construcción genética que comprende un gen cuyo producto génico reemplaza funcionalmente a un oncogén o protooncogén humano expresado naturalmente por dicha célula humana. Por lo tanto, la célula productora se puede modificar para que sea independiente de la expresión normal no patológica de un gen que se pretende que sea inhibido por el oligonucleótido inhibidor. Como resultado, el crecimiento y la viabilidad de la célula productora no pueden verse afectados por la producción del oligonucleótido inhibidor. En particular, el oncogén o protooncogén humano puede ser un miembro de la familia del gen MYC, y la construcción genética introducida en las células puede ser otro miembro de la familia del gen MYC. Por ejemplo, el oncogén humano o protooncogén puede ser c-Myc y la construcción genética puede comprender un gen que codifique N-Myc o L-Myc.

La célula humana puede comprender además una secuencia de ADN que codifique un oligonucleótido inhibidor para dicho oncogén o protooncogén.

La presente descripción proporciona además una célula humana transducida o transfectada con una secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido inhibidor para un oncogén o protooncogén humano, preferiblemente un factor de transcripción oncogénico o proto-oncogénico humano, en el que dicha secuencia de ADN está operativamente vinculada a un promotor inducible.

Una célula humana que comprende una secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido inhibidor para un oncogén o protooncogén humano puede comprender una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-92 y SEQ ID NO: 185-218, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-32, SEQ ID NO: 33-67, y SEQ ID NO: 185-218, más preferiblemente seleccionado de entre SEQ ID NO: 1-9 y SEQ ID NO: 185-196.

La célula humana puede ser una célula madre, preferiblemente una célula madre embrionaria o una célula madre mesenquimal.

Además, la descripción proporciona una célula de mamífero no humana, transducida o transfectada con una secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido inhibidor para un oncogén o protooncogén humano.

Las nanovesículas producidas de acuerdo con la invención se pueden usar para el suministro de un agente terapéutico a una célula, in vitro o in vivo, p. ej. para terapia. Por lo tanto, se proporciona un método para liberar un oligonucleótido inhibidor contra un oncogén humano o protooncogén a una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con una célula humana o una nanovesícula, como se describió anteriormente.

En realizaciones, un método para administrar un oligonucleótido inhibidor contra un oncogén o protooncogén humano a una célula cancerígena in vivo, que comprende los pasos de:

a) administrar a un paciente que tiene dicha célula cancerosa, una célula transducida o transfectada con una secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido inhibidor a un oncogén o protooncogén humano, en el que dicha secuencia de ADN está operativamente unida a un promotor inducible, e

b) inducir la expresión del oligonucleótido inhibidor mediante la administración de una sustancia que activa dicho promotor inducible.

Por lo tanto, pueden usarse nanovesículas, como se describen en este documento, para el tratamiento del cáncer.

También se describe en este documento una composición que comprende nanovesículas, como se describe en este documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición y/o las nanovesículas pueden ser para uso como un medicamento; en particular, para el tratamiento del cáncer. El cáncer que se va a tratar se puede seleccionar del grupo que consiste en melanoma maligno, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer gastrointestinal, cerebral, pulmonar, nasofaríngeo, esofágico, gástrico, hepático, cervical, cáncer de próstata, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma nasal de células NK/T, sarcoma, leucemia, cánceres neuroendocrinos, carcinomas de línea media, neuroblastoma y cánceres de cabeza y cuello.

Descripción detallada del invento

La presente invención se basa en la constatación de que las nanovesículas que se originan en las células, incluidas las células de mamífero, pueden usarse como vehículos para el suministro de moléculas inhibitoras potencialmente terapéuticas que se dirigen a funciones celulares fundamentales, con mayor eficacia y menor riesgo de efectos secundarios adversos, en comparación con tecnologías de liberación de la técnica anterior.

- En particular, los presentes inventores proponen el uso de células y/o vesículas, como se describe en este documento, para el suministro de ácidos nucleicos que pueden inhibir selectivamente o reprimir la producción, o la funcionalidad, de un oncogén o protooncogén o un producto génico correspondiente, por ejemplo, factores de transcripción oncogénicos o proto-oncogénicos y/o moléculas señalizadoras oncogénicas o proto-oncogénicas. El oncogén o protooncogén puede ser un oncogén no mutado.
- Una familia de oncogenes o protooncogenes de particular interés es la familia de genes MYC que consiste en MYC, MYCN y MYCL. La familia de genes MYC codifica tres factores de transcripción diferentes, c-Myc (codificado por MYC), N-Myc (codificado por MYCN) y L-Myc (codificado por MYCL), respectivamente, que regulan una amplia gama de genes y procesos celulares que son cruciales en las enfermedades malignas. Sin embargo, la familia del gen MYC también es activa en la proliferación celular normal.
- El gen que codifica c-Myc, MYC, se encuentra en el cromosoma 8 en el genoma humano. La proteína Myc actúa a través de la unión de las secuencias de Enhancer Box (cajas E) y también reclutando histonas acetiltransferasas (HAT), regulando así la estructura de la cromatina. Se cree que Myc regula la expresión del 15% de todos los genes humanos.
- c-Myc y N-Myc están cadena abajo de las señales mitogénicas como Wnt, Shh y EGF (a través de la vía MAPK/ERK). Dado que estas vías a menudo se activan por la mutación de genes como APC (vía Wnt), PATCHED (vía Shh) y EGFR, BRAF, RAS, PTEN (vía EGF), c-Myc o N-Myc se inducen en células cancerosas.
- El MYC también se puede activar mediante translocación cromosómica a una ubicación cromosómica transcripcionalmente activa, como las del locus de inmunoglobulina en linfocitos B y del receptor de células T en linfocitos T. Estas translocaciones dan como resultado diversas enfermedades malignas hematológicas, como el linfoma de Burkitt o la leucemia linfocítica aguda T.
- Una activación alternativa de los miembros de la familia MYC es a través de la amplificación, lo que ocurre en varios cánceres, incluido el cáncer de pulmón (MYC, MYCN y MYCL), neuroblastoma (MYCN) y cáncer de mama (MYC).
- Al modificar la expresión de otros genes, la activación de Myc produce numerosos efectos biológicos. El primero en ser descubierto fue su capacidad para estimular el metabolismo; p. ej. estimula la transcripción de los genes que codifican la ornitina decarboxilasa y la lactato deshidrogenasa. Myc también impulsa la proliferación celular (p. ej. regulando positivamente las ciclinas, los factores de transcripción E2f y regulando a la baja p21) y desempeña un papel muy importante en la regulación del crecimiento celular (regulando a la alta el ARN ribosómico y las proteínas), la apoptosis (regulando a la baja Bcl-2), la diferenciación y la autorrenovación de las células madre.
- Se ha demostrado que el reconocimiento de las proteínas Myc más comunes, c-Myc, con moléculas pequeñas es extremadamente difícil porque la estructura de la proteína terciaria carece de bolsas que puedan funcionar como sitios de unión para pequeñas moléculas inhibitorias. Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de proteínas Myc puede bloquearse mediante moléculas de ARNi (Wang, H., y col., c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene*, 2008. 27 (13): p. 1905-15).
- Un conjunto de genes que se regulan cadena abajo de Myc y otras vías de señalización celular son los activadores transcripcionales de la familia E2F. E2F1, E2F2 y E2F3A codifican factores de transcripción que estimulan los genes implicados en la progresión del ciclo celular como ciclina E y Cdk2, componentes de la replicación del ADN (por ejemplo, ADN polimerasa, proteína de unión de origen de replicación HsOrc1, MCM 5 y cdc6) y biogénesis de nucleótidos (timidina quinasa y dihidrofolato reductasa). La familia E2F también contiene represores transcripcionales (E2f3b y E2f4-8).
- Los activadores de E2f están unidos por la proteína de retinoblastoma pRB, codificada por el gen RB1. Cuando se unen, las proteínas E2f son incapaces de estimular la progresión del ciclo celular. Para estimular la progresión del ciclo celular, pRB se fosforila mediante cinasas dependientes de ciclina Cdk2, Cdk4 y Cdk6 en sitios múltiples. Esto libera E2f unido de pRB, lo que da como resultado la activación de E2f. Las células cancerosas pueden exhibir actividades elevadas de E2f debido a muchas razones, incluida la pérdida del gen RB1 o los genes CDKN2A-C. Estos últimos codifican los inhibidores de Cdk p15, p16 y p18, denominados colectivamente proteínas Ink4, que inhiben Cdk4 y Cdk6. Otras formas de activar la actividad constitutiva de E2f es mediante la transcripción génica directa de los genes CDK4, CCND2 e incluso E2F1 por las proteínas Myc, o mediante mutaciones de Cdk4 resistentes a Ink4.
- El reconocimiento de las proteínas E2f más comunes, E2f1, con moléculas pequeñas es difícil ya que es un factor de transcripción y, por lo tanto, carecen de un sitio enzimático activo. Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de E2f1 se puede bloquear mediante moléculas de ARNi en el melanoma, lo que da como resultado la detención del ciclo celular y la senescencia. (Verhaegen y col., E2F1-Dependent Oncogenic Addiction of Melanoma Cells to MDM2 *Oncogene*. 16 Feb, 2012; 31(7)828-841).
- En realizaciones de la invención, las moléculas de señalización reconocidas por la molécula inhibidora pueden ser moléculas de señalización que carecen de actividad enzimática. Las moléculas de señalización reconocidas por la molécula inhibidora pueden incluir moléculas de señalización implicadas en la transducción de señal intracelular, p.

ej., regulando el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia, como la familia de proteínas Ras, incluidas Kras, Hras y Nras.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, las nanovesículas que contienen una molécula inhibidora pueden producirse in vitro, a partir de células animales cultivadas in vitro, típicamente células de mamífero tales como células murinas o humanas. Las células a partir de las cuales se producen las nanovesículas se denominan en la presente memoria "células productoras". En la realización de la invención, las nanovesículas pueden comprender exosomas y otras vesículas extracelulares liberadas naturalmente de las células, así como vesículas artificiales producidas por extrusiones en serie de células a través de micro- y/o nano-filtros. En otras realizaciones de la invención, las nanovesículas son nanovesículas artificiales, que pueden producirse mediante extrusiones en serie de células a través de micro- y/o nano-filtros. Se sabe que la extrusión de células a través de filtros desintegra las células y que la membrana celular y las fracciones de membrana se vuelven a ensamblar en el proceso. El rendimiento de las vesículas producidas por tal método es mucho más alto que el de los exosomas producidos naturalmente.

Las nanovesículas artificiales usadas en las realizaciones de la presente invención se pueden producir mediante extrusiones en serie de células productoras, típicamente células de mamífero, a través de micro- y/o nano-filtros. Las nanovesículas se pueden producir mediante un método como se describe en el documento US 2012/0177574; ver, en particular, los párrafos [0173] - [0197]. Las nanovesículas así producidas artificialmente retienen la estructura de membrana de las células productoras, tales como la estructura de bicapa lipídica y las proteínas de membrana, incluida la topología de las moléculas de la superficie de la membrana celular. Además, las nanovesículas retienen los mismos componentes citoplasmáticos que la célula productora.

Una nanovesícula según las realizaciones de la invención puede tener un tamaño de hasta 500 nm, por ejemplo, hasta 300 nm, tal como hasta 250 nm o 200 nm. Por ejemplo, las nanovesículas pueden tener un tamaño en el intervalo de 100-200 nm. Sin embargo, en algunas realizaciones, las nanovesículas pueden ser más pequeñas que 100 nm, por ejemplo, al menos 50 nm o al menos 80 nm.

En realizaciones de la invención, exosomas y otras vesículas, p. ej. las microvesículas, producidas y liberadas naturalmente por las células, también pueden contener la molécula inhibidora y, opcionalmente, también expresar una molécula diana en su superficie.

Los exosomas, las microvesículas y las nanovesículas artificiales tienen varias similitudes, pero también hay diferencias importantes entre estas vesículas. Los exosomas se producen a través de un proceso natural, que involucra la gemación interna de la membrana celular y se forman a través de cuerpos multivesiculares. Los exosomas están cargados con materiales muy específicos, incluido el ARN, que no es una selección aleatoria de contenido celular. Además, los exosomas son estructuras muy ajustadas, que se ha demostrado que son difíciles de cargar con ARNips externos (Wahlgren et al., *Nucleic Acids Res.* 1 de septiembre de 2012; 40 (17): e130). Las microvesículas, por otro lado, en algún experimento parecen contener mucho menos ARN que los exosomas.

Las nanovesículas artificiales, producidas por extrusiones seriales de células a través de micro- y nano-filtros, contienen cualquier proteína en su superficie que la célula no tenga, y también contiene una selección aleatoria del citoplasma. Por lo tanto, la sobreexpresión de la molécula de superficie diana en la membrana celular de una célula modificada producirá la presencia de esa molécula en las nanovesículas artificiales. Del mismo modo, una molécula sobreexpresada dentro de la célula, también estará presente dentro de la nanovesícula artificial en altas concentraciones. Lo que es más importante, se espera que el rendimiento de las nanovesículas artificiales sea significativamente mayor que el rendimiento de los exosomas u otras vesículas extracelulares liberadas naturalmente por una célula.

En realizaciones de la invención, la molécula inhibidora contenida dentro de las nanovesículas puede ser un ácido nucleico, típicamente una molécula de ARNi tal como ARNh<sub>c</sub>, ARNpiwi o ARNm<sub>i</sub>, y típicamente ARNh<sub>c</sub> o ARNpiwi.

La interferencia de ARN, conocida como ARNi, es un mecanismo de regulación de genes que se produce en muchas células eucariotas. El ARNi está mediado por la enzima Dicer, que escinde una molécula de ARN bicatenaria larga (dsRNA) en grupos más cortos de ARN de doble cadena, ARN de interferencia pequeño (ARNpiwi). Las cadenas de ARNpiwi se separan en dos moléculas de ARN monocatenario, ARNs<sub>s</sub>, y la cadena guía se incorpora a un complejo llamado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y puede silenciar la expresión del gen mediante unión complementaria a una molécula de ARNm. El mecanismo de ARNi puede utilizarse para el silenciamiento selectivo de un gen de interés mediante expresión genéticamente modificada en una célula de una molécula pequeña de ARN en horquilla (ARNh<sub>c</sub>), que contiene una secuencia de nucleótidos diseñada para silenciar un ARNm particular y que posteriormente es escindida por Dicer en ARNip.

Como se usa en el presente documento, "molécula de ARNi" típicamente se refiere a cualquier molécula de ARN implicada en un proceso de ARNi, incluyendo por ejemplo ARNds, ARN de horquilla corta (ARNh<sub>c</sub>, que se puede usar como material de partida en lugar del ARNds), miARN, ARNpiwi y ARNs<sub>s</sub>.

El uso de oligonucleótidos inhibidores, y ARNi en particular, tiene muchas ventajas respecto a los fármacos de moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas presentan problemas con la solubilidad, lo que las hace imposibles

- de formular para el suministro in vivo. Una vez formuladas, también pueden presentar problemas de absorción, lo que requiere la administración por vía intravenosa, en lugar de oral. La molécula pequeña también puede estar unida a proteínas séricas o puede estar impedida su entrada; p. ej., un tumor debido a una presión intersticial demasiado alta, lo que da como resultado una mala distribución. Las moléculas pequeñas también se pueden distribuir sistémicamente, lo que da como resultado una menor concentración intratumoral. Las moléculas pequeñas también pueden metabolizarse, lo que reduce la estabilidad y la posible producción de productos tóxicos secundarios. La disminución de los niveles de equilibrio también puede ser el resultado de la excreción. Finalmente, las moléculas pequeñas pueden tener objetivos múltiples y exhibir toxicidad en un organismo multicelular viviente. Los oligonucleótidos, por otro lado, se degradan rápidamente en residuos no tóxicos.
- 5 En realizaciones de la invención, la molécula inhibidora puede ser una molécula de ARNi que puede lograr la inhibición de un miembro de la familia Myc. En dichas realizaciones, la molécula inhibidora puede comprender una secuencia de ARN seleccionada de entre SEQ ID N°: 93-124, por ejemplo, seleccionada de SEQ ID N°: 93-102 (ARN dirigida a c-myc), SEQ ID N°: 103-111 (dirigida a L-myc) o SEQ ID NO: 112-124 (dirigida a N-myc).
- 10 En realizaciones de la invención, la molécula inhibidora puede ser una molécula de ARNi que puede lograr la inhibición de un miembro de la familia E2F, por ejemplo, E2f1, E2f2 o E2f3. Dichas moléculas inhibidoras pueden comprender una secuencia de ARN seleccionada de SEQ ID NO: 125-159, por ejemplo, SEQ ID NO: 125-140 (dirigida a E2f1), SEQ ID NO: 141-148 (dirigida a E2f2), o SEQ ID NO: 149-159 (dirigida a E2f3).
- 15 En aún otras realizaciones de la invención, la molécula inhibidora puede ser una molécula de ARNi que puede lograr la inhibición de un miembro de la familia Ras, por ejemplo, Hras, Kras o Nras. Dichas moléculas inhibidoras pueden comprender una secuencia de ARN seleccionada de SEQ ID NO: 160-184, por ejemplo, seleccionada de SEQ ID NO: 160-171 (dirigida a Hras), SEQ ID NO: 172-177 (dirigida a Kras) o SEQ ID NO: 178-184 (dirigida a Nras).
- 20 Para producir nanovesículas que tienen el contenido deseado de moléculas inhibidoras, en particular moléculas de ARNi, tales como ARNhc o ARNsi, se puede insertar una secuencia de ADN que codifica la molécula inhibidora en la célula productora usando técnicas de ingeniería genética convencionales, p. ej., usando un vector viral. Vectores adecuados para obtener, p. ej., la expresión de ARNhc en animales, p. ej., las células de mamífero son conocidas por las personas expertas en la técnica, y pueden incluir vectores basados en virus adenoasociados, adenovirus o retrovirus/lentivirus.
- 25 Por lo tanto, una secuencia de ADN que codifica la molécula inhibidora de interés se puede introducir en las células productoras, que se puede mantener en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de ADN, es decir, la producción de la molécula inhibidora dentro de las células productoras. Mediante la introducción de una secuencia de ADN que codifica la molécula inhibidora, la molécula inhibidora puede expresarse en grandes cantidades dentro de la célula productora y localizarse en el citosol. Por ejemplo, el ARNhc codificado por una secuencia de DNA se transloca por la maquinaria celular al citosol, donde se puede procesar en ARNip. Cuando la molécula inhibidora se expresa y está presente en el compartimento citosólico de la célula productora, la molécula inhibidora también estará presente en las nanovesículas producidas a partir de las células, ya que las nanovesículas tienen la misma composición citosólica que la célula productora. Las nanovesículas producidas a partir de células que expresan un ARNhc contendrán así, por ejemplo, ARNhc y/o ARNip que se origina a partir del ARNhc, típicamente ARNip.
- 30 Alternativamente, una molécula inhibidora, tal como un oligonucleótido, puede cargarse directamente en nanovesículas aisladas.
- 35 En realizaciones de la invención, la molécula inhibidora es una molécula de ARNi, típicamente ARNhc o ARNpiwi, para la inhibición o represión de un gen o producto genético MYC humano.
- 40 Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc contra c-Myc humano, se puede introducir una secuencia de DNA en la célula productora que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9; alternativamente, se puede introducir una secuencia de ADN que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195 y SEQ ID NO: 196.
- 45 Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc contra L-Myc humano, se puede introducir una secuencia de ADN en la célula productora que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19. Alternativamente, se puede introducir una secuencia de ADN que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, y SEQ ID NO: 205.
- 50 Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc o ARNip contra N-Myc humano, se puede introducir una secuencia de ADN en la célula productora que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32. Alternativamente, se puede introducir una secuencia de ADN que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO:
- 55

208, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217, y SEQ ID NO: 218.

Los plásmidos lentivirales que contienen las secuencias de ADN de SEQ ID NO: 185-218 están disponibles comercialmente en Sigma Aldrich (USA).

5 En otras variantes descritas en este documento, la molécula inhibidora es una molécula de ARNi, típicamente ARNhc o ARNpiwi, para la inhibición o represión de un gen o producto de gen E2F humano. Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc contra E2f1 humana, se puede introducir una secuencia de ADN en la célula productora que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID N°: 33-48. Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc contra E2f2 humano, se puede introducir una secuencia de DNA en la célula productora que  
10 comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 49-56. Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc contra E2f3 humano, se puede introducir una secuencia de DNA en la célula productora que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 57-67.

15 En otras variantes descritas en este documento, la molécula inhibidora es una molécula de ARNi, típicamente ARNhc o ARNpiwi, para la inhibición o represión de un gen o producto de gen RAS humano. Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc contra Hras humano, se puede introducir una secuencia de DNA en la célula productora que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 68-79. Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc contra Kras humano, se puede introducir una secuencia de ADN en la célula productora que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 80-85. Para expresar una molécula de ARNi tal como ARNhc contra Nras humanas, se puede introducir una secuencia de ADN en la célula productora que comprende  
20 una secuencia seleccionada de SEQ ID N°: 86-92.

La secuencia de ADN que codifica la molécula inhibidora está típicamente bajo el control de un promotor. El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible.

25 En realizaciones de la invención, por ejemplo, cuando las células productoras son células humanas dependientes de una proteína c-Myc humana funcional para su propia proliferación, puede ser preferible usar un promotor inducible, de modo que la expresión de la molécula inhibidora pueda iniciarse en un punto adecuado en el tiempo, tal como cuando se ha logrado un número deseado de células productoras o una densidad de células productoras deseables. Puede usarse cualquier promotor convencional adecuado, por ejemplo, un promotor inducible por doxiciclina.

30 En otras realizaciones, las células productoras pueden ser independientes de la función del gen diana que la molécula inhibidora pretende inhibir o reprimir. En dichas realizaciones, el promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Tal como se usa en la presente memoria, "gen diana" se refiere a un gen que se inhibirá o reprimirá por la molécula inhibidora, mientras que el producto génico se inhibirá o reprimirá mediante la molécula inhibidora.

35 Por ejemplo, pueden usarse células o bacterias animales no humanas como células productoras para la producción de nanovesículas que contienen una molécula inhibidora dirigida a un gen humano o producto génico. Por ejemplo, las células de ratón pueden usarse para la producción de una molécula de ARNi (y nanovesículas que contienen la molécula de ARNi) contra un gen humano, p. ej., un miembro de la familia de genes MYC humanos, como c-Myc humano, al menos cuando los genes murinos y humanos no tienen una similitud de secuencia demasiado alta. Alternativamente, se pueden usar células productoras de la misma especie que el gen diana, que se ha modificado para que sea independiente del gen diana. Como ejemplo, las células humanas que se utilizarán para la producción de una molécula de ARNi contra un primer miembro de la familia MYC pueden modificarse para sobreexpresar a otro miembro de la familia del gen MYC, de modo que se independice de la funcionalidad del primer miembro MYC. En particular, las células humanas pueden modificarse genéticamente usando técnicas estándar para sobreexpresar N-myc, que normalmente se expresa solo en niveles bajos, que pueden reemplazar funcionalmente c-Myc y hacer que las células sean independientes de c-Myc. Por lo tanto, la expresión de una molécula de ARNi contra c-MYC  
40 humano dentro de las mismas células productoras no interrumpirá el crecimiento y la proliferación celular. Alternativamente, el c-Myc nativo de una célula humana puede modificarse genéticamente, p. ej., mediante la introducción de una o más mutaciones puntuales para evitar la complementariedad con una molécula de ARNi dirigida contra c-Myc humano y así evitar la inhibición del c-Myc de la célula productora.

45 En realizaciones de la invención, las nanovesículas se pueden producir a partir de células tal como se describió anteriormente, sin la inserción de una secuencia de ADN que codifica la molécula inhibidora. En dichas realizaciones, la molécula inhibidora puede introducirse ("cargarse") directamente en las nanovesículas aisladas usando electroporación o similar. Por ejemplo, una molécula de ARNi tal como ARNpiwi puede insertarse directamente en las nanovesículas aisladas mediante electroporación. Estudios previos sugieren que este enfoque puede ser eficiente para la administración a exosomas (Alvarez-Erviti, L., et al., Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nat Biotechnol, 2011. 29 (4): p. 341-5;).  
50

55 Las células usadas como células productoras en la presente invención pueden ser cualquier célula eucariótica que sea capaz de formar nanovesículas y que sea susceptible de expresar una molécula inhibidora. Típicamente, las células pueden ser células animales, en particular células de mamífero, que incluyen células murinas y humanas.

Además, las células usadas como células productoras pueden originarse a partir de una línea celular adecuada para la proliferación, modificación y expresión in vitro de la molécula inhibidora, y la producción de las nanovesículas. Las células pueden ser células madre. Los ejemplos de células adecuadas incluyen células embrionarias de riñón humano (HEK, p. HEK 293), células madre mesenquimales, fibroblastos (p. ej., fibroblastos de ratón NIH 3T3) o cualquier otra célula eucariota adecuada. Las células madre mesenquimales pueden producirse a partir de otras células, como las células embrionarias, o por medios autólogos (por lo tanto, del paciente para el que se destina la terapia).

Con el fin de lograr la administración selectiva de las nanovesículas a una célula cancerosa, las nanovesículas pueden tener una molécula diana presente en la superficie externa de su membrana. Preferiblemente, la molécula diana puede ser una molécula, p. ej., un ligando, que se une selectivamente a otra molécula, p. ej., un receptor de ligando, que sea específico de la superficie de las células cancerosas o que esté sobrerrepresentado (sobrexpresado) en la superficie de las células cancerosas. Los ejemplos de moléculas diana adecuadas incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que se une al receptor EGF (EGFR) y la hormona estimulante de melanocitos (MSH), que se une al receptor MSH (MSHR, también llamado receptor de melanocortina 1, MC1R). EGFR está sobreexpresado en la mayoría de los tipos de células epiteliales de cáncer, mientras que MC1R se expresa en melanoma y células del linaje de melanocitos. Recientemente, se demostró que los exosomas que sobreexpresan péptidos similares al EGF, que usan el dominio transmembrana del factor de crecimiento derivado de plaquetas, pueden dirigirse a tumores que expresan EGFR in vivo en ratones (Ohno, S.I., y col., Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. Mol Ther, 2012). Las moléculas dirigidas también pueden incluir ligandos naturales o incluso fragmentos de anticuerpos modificados genéticamente que poseen la capacidad de unirse a antígenos de superficie específicos del cáncer.

Para introducir la molécula diana en las nanovesículas, se puede introducir una secuencia de ADN que comprende una secuencia de ADN, tal como un gen, que codifica la molécula diana usando técnicas de clonación convencionales, que incluyen cualquier secuencia tal como un promotor, etc. necesaria para lograr la expresión de la molécula diana dentro de la célula. La molécula diana puede ser una molécula que se localiza naturalmente en la superficie externa de la membrana celular. Alternativamente, la molécula diana puede ser una proteína de fusión con una proteína transmembrana, tal como una proteína anclada a GPI o el dominio transmembrana/citosólico de ICAM-1 (T/C ICAM-1).

Cuando la molécula diana se localiza en la membrana celular, la molécula diana también formará parte de la membrana de la nanovesícula después del aislamiento de las nanovesículas como se describió anteriormente. La modificación genética de una célula productora para expresar una molécula diana en la superficie de la membrana celular puede llevarse a cabo antes de la etapa de introducción de una secuencia de ADN que codifica la molécula inhibidora en la célula productora. Alternativamente, en realizaciones de la invención, la secuencia de ADN que codifica la molécula diana y la secuencia de ADN que codifica la molécula inhibidora pueden introducirse simultáneamente en la célula productora. La introducción de una molécula diana en la superficie de la célula productora y, por lo tanto, también en sus vesículas extracelulares naturales, o las nanovesículas producidas por extrusión en serie a través de membranas, se puede realizar también en realizaciones donde las células productoras no expresan las moléculas inhibidoras, y las nanovesículas se aíslan y posteriormente se usan para la introducción directa de una molécula inhibidora, por ejemplo, vía electroporación.

La presente invención ofrece un medio para desarrollar terapias exitosas contra numerosas enfermedades, incluyendo cánceres. Las nanovesículas de acuerdo con las realizaciones de la invención se pueden administrar a un paciente que padece un cáncer causado, al menos en parte, por el oncogén o protooncogén contra el que se dirige la molécula inhibidora. Las nanovesículas pueden administrarse por inyección intravenosa o directamente en tumores, o en órganos que contienen tumores o en partes del cuerpo afectadas por tumores, opcionalmente como parte de una composición farmacéutica.

Una composición farmacéutica puede comprender las nanovesículas y típicamente también un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas adecuadas para la inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Típicamente, la composición es estéril. Además, la composición puede ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de inyección. Preferiblemente, la composición es estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se conserva preferiblemente frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

La administración de una composición farmacéutica puede efectuarse a través de cualquier ruta adecuada, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intramuscular, en cerebro, en fluido espinal, subcutánea, directamente en tumores o tejidos infestados de tumor, o miembros, o intraocular, o intranasal, o por inhalación, o por vía oral y/o intraperitoneal.

Las nanovesículas pueden ser internalizadas por las células cancerosas de una manera similar a los exosomas y otras vesículas, y por lo tanto suministrar su carga de molécula inhibidora al interior de una célula cancerosa, donde la molécula inhibidora puede realizar su función inhibidora, p. ej. a través del ARNi.

Adicionalmente o alternativamente, las células productoras descritas en este documento se pueden administrar directamente a un paciente, por ejemplo, directamente en un tumor, sin aislamiento previo de nanovesículas. En tales casos, las células expresan preferiblemente una molécula diana en la superficie de la célula, de modo que se localizan muy cerca de las células cancerosas después de la administración. La administración puede efectuarse a través de cualquier ruta adecuada, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intramuscular, en el cerebro, en el líquido cefalorraquídeo, subcutánea, directamente en tumores o tejidos infestados de tumor, o en las extremidades, intraocular, intranasal o por inhalación, u oral y/o intraperitoneal. Además, en tales casos, la secuencia de ADN que codifica la molécula inhibidora está preferiblemente bajo el control de un promotor inducible, tal como un promotor inducible por doxiciclina. Después de la administración de las células, la expresión de la molécula inhibidora puede inducirse mediante la administración de doxiciclina al paciente por cualquier ruta adecuada, p. ej., por vía oral o intravenosa. Tras la expresión de una molécula de ARNi, las células estarán estresadas y, como resultado, liberarán altas cantidades de exosomas y otras vesículas durante un corto período de tiempo, lo que conducirá a una alta concentración de vesículas que contienen ARNi en las proximidades de las células tumorales, que luego, a través de medios naturales tomará las vesículas, y la molécula de ARNi tendrá su efecto terapéutico dentro de la célula tumoral mediante la inhibición de proto-oncogenes cruciales tales como c-Myc u otros factores de transcripción. La expresión alta y/o prolongada de la molécula inhibidora en la célula inyectada probablemente inducirá apoptosis, lo que puede dar como resultado una liberación adicional del inhibidor molecular de la célula a través de cuerpos apoptóticos, que también pueden liberar su carga a células tumorales receptoras. Como resultado, la molécula de ARNi se encapsulará en nano- y micro-vesículas de origen natural en las proximidades de las células tumorales, y posteriormente entrarán en las células cancerosas y producirán ARNi. La encapsulación de la molécula de ARNi en vesículas es importante, ya que las moléculas de ARNi se degradarían naturalmente si estuvieran presentes como moléculas libres en el tejido intersticial (extracelularmente).

La presente invención ofrece una herramienta terapéutica que podría usarse potencialmente en el tratamiento de numerosas enfermedades cancerosas. El gen c-Myc puede estar sobreexpresado en hasta el 80% de todos los cánceres (Nilsson & Cleveland *Oncogene*. 8 Dic., 2003; 22(56):9007-21).

Un ejemplo de un cáncer que podría tratarse usando células o nanovesículas producidas de acuerdo con las realizaciones de la presente invención es el melanoma. Se ha demostrado previamente que la inhibición de c-Myc puede ser eficaz para provocar la senescencia en la mayoría de las líneas celulares de melanoma humano maligno (Wang et al., 2008). Además, la inhibición de Myc por expresión sistémica de un mutante Myc interferente dominante en un modelo murino de adenocarcinoma de pulmón inducido por Ras desencadena la regresión rápida de tumores pulmonares incipientes y establecidos, confirmando que la selección de Myc puede ser eficaz en el tratamiento de tumores malignos (Soucek, L., et al., *Modelling Myc inhibition as a cancer therapy*. *Nature*, 2008. 455 (7213): p. 679-83). En conjunto, estos estudios previos sugieren que muchos tumores malignos, incluido el melanoma, dependen de c-Myc.

Una nanovesícula producida de acuerdo con las realizaciones de la invención que a) reconoce células de melanoma maligno, y b) contiene una molécula de ARNi que regula negativamente un oncogén cadena abajo o un factor de transcripción crucial para las células de melanoma, puede, por lo tanto, ser posible de utilizar en el melanoma uveal metastásico, así como en los melanomas cutáneos metastásicos, independientemente del estado de mutación de los oncogenes. Se cree que los genes c-Myc y E2f1 son genes diana muy adecuados para dicha terapia, ya que se ha demostrado que son cruciales en el melanoma en general. Por último, una célula o nanovesícula dirigida a un melanoma también podría usarse como terapia local en el ojo en el melanoma uveal sin metástasis, o como terapia adyuvante junto con la extirpación local del tumor, posiblemente evitando la enucleación.

c-Myc también se ha asociado con el carcinoma de cuello uterino, colon, mama, pulmón y estómago, y la invención también puede ser útil en la terapia de tales tumores malignos.

Por lo tanto, además del melanoma, las células y/o las nanovesículas que se dirigen, por ejemplo, a neoplasias positivas para EGFR y que contienen un inhibidor de c-Myc, pueden ser un abordaje terapéutico putativo para muchas enfermedades malignas.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Introducción de la molécula diana en la superficie de las células productoras humanas

En primer lugar, se crean vectores pCMV-zeo que expresan EGF o MSH en marco con una proteína de anclaje GPI o I-CAM1 y se transfectan en células HEK 293 o células madre mesenquimatosas. Las células transfectadas se tratan con zeocina y las células resistentes se clasifican en función de la expresión superficial de EGF o MSH usando perlas magnéticas o un clasificador de células. El mantenimiento de la expresión transgénica se puede controlar rutinariamente con citometría de flujo.

Las células que expresan proteínas de fusión EGF o MSH se pueden usar además para la producción de nanovesículas, opcionalmente con la expresión de una molécula inhibidora.

Ejemplo 2: Producción de nanovesículas que utilizan células humanas modificadas para ser independientes de c-Myc

A. Modificación de células humanas para ser independientes en c-Myc

Un vector de expresión de mamífero que contiene un receptor de retrovirus murino (mCAT-1) y una fusión N-Myc:GFP separada por un IRES (para permitir la traducción independiente del extremo) se transfecta en células HEK 293T o células madre mesenquimales. La línea celular utilizada puede estar equipada con un receptor ecotrópico para lentivirus pseudotipados con envoltura específica de murino para aumentar la seguridad del personal. Además, usando un vector pcDNA-neo para la clonación, también es posible expresar un casete de resistencia a la neomicina. Alternativamente, en lugar de un gen N-Myc, el vector de expresión puede contener un gen L-myc, si el inhibidor se dirige a c-Myc.

El vector se clona en células humanas usando el nucleofector Amaxa, o cualquier otra metodología adecuada. Las células transducidas con éxito se seleccionan con neomicina y clasificación FACS para células positivas a GFP.

B. Introducción de una secuencia de ADN que codifica un inhibidor para una proteína Myc humana en las células productoras de nanovesículas

Un plásmido lentiviral obtenido de Sigma Aldrich, EE.UU. (clones MISSION TRCpLKO-puro) que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 185-196 se transfecta en células HEK 293T. Cuando se transfectan en células, se generan transcritos basados en VIH-1 que se han vuelto incompetentes para la replicación y se auto-inactivan mediante una delección en la repetición terminal de 3'. Además, el vector lentiviral se co-transfecta con pCMV-dR8.2 dvpr y pHCMV-Eco (ambos del depósito de plásmidos Addgene), el primero que contiene un vector mínimo que expresa HIV-GAG y el último una envoltura eco-trópica. Las células HEK 293T producirán, por lo tanto, lentivirus que son incompetentes para la replicación y solo pueden infectar células murinas o células que expresan el receptor de retrovirus murino (mCAT1) como en el Ejemplo 2A. A continuación, las células HEK 293T se cultivan y el sobrenadante de cultivo celular que contiene virus de las células transfectadas se usa para transducir células humanas que expresan mCAT1, seguido de la selección con puromicina (codificada por el plásmido lentivirus). Dado que las células humanas que expresan mCAT1 dependen del gen N-Myc y no del gen diana humano, p. ej. c-Myc, su crecimiento o viabilidad pueden no verse afectados por la expresión de una molécula inhibidora dirigida contra un gen objetivo humano, p. ej., c-Myc humano.

C. Aislamiento de nanovesículas

El aislamiento de nanovesículas y/o vesículas extracelulares de origen natural se puede realizar mediante procedimientos conocidos, que incluyen etapas de centrifugación. Por ejemplo, pueden producirse nanovesículas artificiales como se describe en el documento US 2012/0177574. Las vesículas artificiales de alta densidad que emergen de las membranas nucleares se pueden eliminar mediante unos breves pasos de centrifugación. Las nanovesículas que expresan la molécula que se dirige, por ejemplo, al receptor de EGF pueden purificarse mediante selección positiva o negativa, usando protocolos de clasificación FACS avanzados, métodos magnéticos o cualquier otro método, usando tecnología de anticuerpos.

Ejemplo 3: Producción de nanovesículas con células humanas (expresión inducible)

A. Introducción de una secuencia de ADN que codifica un inhibidor contra una proteína Myc (expresión inducible) en células humanas

Se usa un sistema de expresión inducible por tetraciclina (doxiciclina) o IPTG para clonar la secuencia de ADN de la molécula inhibidora deseada (aquí una secuencia de ADN de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID N°: 185-218). Por ejemplo, se puede usar el sistema pLKO-TetON-puro (Addgene) o el sistema pLKO\_IPTG\_3 × LacO (Sigma).

B. Aislamiento de nanovesículas (opcional)

El aislamiento de nanovesículas y/o vesículas extracelulares de origen natural se puede realizar mediante procedimientos conocidos, que incluyen etapas de centrifugación. Por ejemplo, pueden producirse nanovesículas artificiales como se describe en el documento US 2012/0177574. Las vesículas artificiales de alta densidad que emergen de las membranas nucleares se pueden eliminar mediante unos breves pasos de centrifugación. Las nanovesículas que expresan la molécula que se dirige, por ejemplo, al receptor de EGF pueden purificarse mediante selección positiva o negativa, usando protocolos de clasificación FACS avanzados, métodos magnéticos o cualquier otro método, usando tecnología de anticuerpos.

Alternativamente, en lugar de aislar las nanovesículas, la molécula inhibidora puede recuperarse del cultivo celular y usarse posteriormente para la introducción directa en nanovesículas, p. ej. usando electroporación. En tales realizaciones, las moléculas inhibidoras pueden introducirse en nanovesículas producidas artificialmente como se describió anteriormente.

Alternativamente, en lugar de usar la producción de nanovesículas artificiales por extrusión secuencial, las vesículas extracelulares que se liberan naturalmente de la célula productora modificada genéticamente, por ejemplo, exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos, pueden aislarse del cultivo celular. Tales vesículas extracelulares naturales expresarán tanto la molécula diana en su superficie como también contendrán la molécula inhibidora.

## Ejemplo 4: Producción de nanovesículas con células murinas

## A. Introducción de la secuencia de ADN que codifica un inhibidor de Myc en células murinas

Un plásmido lentiviral obtenido de Sigma Aldrich, EE.UU. (clones MISSION TRCpLKO-puro) que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 185-218 se transfecta en células HEK 293T. Cuando se transfectan en células, se generan transcritos basados en VIH-1 que se han vuelto incompetentes por replicación mediante una delección en la repetición terminal de 3' de longitud. Además, el vector lentiviral se co-transfecta con pCMV-dR8.2 dvpr y pHCMV-Eco (ambos del depósito de plásmidos Addgene), el primero que contiene un vector mínimo que expresa HIV-GAG y el último una envoltura eco-trópica. Las células HEK 293T producirán lentivirus que son incompetentes para la replicación y solo pueden infectar células murinas. A continuación, se cultivan las células HEK 293T y se usa el sobrenadante del cultivo celular que contiene el virus de las células transfectadas para transducir fibroblastos de ratón NIH 3T3, seguido de una selección con puromicina (codificada por el plásmido del lentivirus). Dado que los fibroblastos de ratón dependen de su gen de ratón nativo y no del gen objetivo humano, p. ej., c-Myc, su crecimiento o viabilidad pueden no verse afectados por la expresión de una molécula inhibidora dirigida contra un gen objetivo humano, p. ej., c-Myc humano.

## 15 B. Aislamiento de nanovesículas

El aislamiento de nanovesículas y/o vesículas extracelulares de origen natural se puede realizar mediante procedimientos conocidos, que incluyen etapas de centrifugación. Por ejemplo, pueden producirse nanovesículas artificiales como se describe en el documento US 2012/0177574. Las vesículas artificiales de alta densidad que emergen de las membranas nucleares pueden eliminarse mediante breves pasos de centrifugación. Las nanovesículas que expresan la molécula que se dirige, por ejemplo, al receptor de EGF pueden purificarse mediante selección positiva o negativa, usando protocolos de clasificación FACS avanzados, métodos magnéticos o cualquier otro método, usando tecnología de anticuerpos.

## Listado de secuencias

<110> Lötval, Jan Nilsson, Jonas

25 <120> Administración de agentes terapéuticos

<130> PC-21066928

<160> 218

<170> PatentIn version 3.5

30 <210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia diana c-Myc ADN

35 <400> 1

cagttgaaac acaaactga a 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia diana c-Myc ADN

<400> 2

ccataatgta aactgcctca a 21

45 <210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> secuencia diana c-Myc ADN

<400> 3  
 caggaactat gacctcgact a 21  
  
 <210> 4  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ADN  
  
 <400> 4  
 10 gcttcaccaa caggaactat g 21  
  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ADN  
  
 <400> 5  
 actgaaagat ttagccataa t 21  
  
 <210> 6  
 20 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ADN  
  
 25 <400> 6  
 ccagaggagg aacgagctaa a 21  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ADN  
  
 <400> 7  
 tacggaactc ttgtgcgtaa g 21  
  
 <210> 8  
 35 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 40 <223> secuencia diana c-Myc ADN  
  
 <400> 8  
 cctgagacag atcagcaaca a 21  
  
 <210> 9  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ADN  
  
 <400> 9  
 50 atcatcatcc aggactgtat g 21

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ADN

<400> 10  
 actcggtgca gccgtatttc t 21

10 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN

15 <400> 11  
 cctgtgccac taaactacat t 21

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN

<400> 12  
 cgaggacatc tggaagaaat t 21

25 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN

30 <400> 13  
 cattggctct tctcaagctc t 21

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN

<400> 14  
 caggaactac gcctccatca t 21

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN

<400> 15  
 cccaagcgac tcgggtaagg a 21

<210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN

50

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN  
 <400> 16  
 5 tggcgcttag agaggacaat a 21  
 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN  
 <400> 17  
 tgttggtaaa cagttggaa a 21  
 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN  
 <400> 18  
 20 tctccagttg gcttacttt a 21  
 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ADN  
 <400> 19  
 gaggcttaga gatagacaat c 21  
 <210> 20  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 20  
 cagcagcagt tgctaaagaa a 21  
 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 21  
 45 gcgtgcaga aaccacaaca t 21  
 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>

<223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 22  
 ctgagcgatt cagatgatga a 21  
 5 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 10 <400> 23  
 gccagtatta gactggaagt t 21  
 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 24  
 cggacgaaga tgacttctac t 21  
 20 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 25  
 cacctccatg acagcgctaa a 21  
 <210> 26  
 <211> 21  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 26  
 35 ctctaccg gacgaagatg a 21  
 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 27  
 agacagcagc agtgctaaa g 21  
 <210> 28  
 45 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 50 <400> 28

catacctaag tactgtaata a 21  
 <210> 29  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 29  
 tcggacttgc tagacgcttc t 21  
 10 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 30  
 acgtccgctc aagagtgta t 21  
 <210> 31  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 31  
 25 cacggagatg ctgcttgaga a 21  
 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ADN  
 <400> 32  
 acgtgccgga gttggtaaag a 21  
 <210> 33  
 35 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
 40 <400> 33  
 taactgcact ttcggccctt t 21  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
 <400> 34  
 catccagctc attgccaaga a 21  
 50 <210> 35

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
 <400> 35  
 taagagcaaa caaggcccga t 21  
  
 <210> 36  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
 <400> 36  
 15 acctcttcga ctgtgactt g 21  
  
 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
 <400> 37  
 acatcaccaa cgtccttgag 20  
  
 <210> 38  
 25 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
 30 <400> 38  
 ctactcagcc tggagcaaga a 21  
  
 <210> 39  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
 <400> 39  
 caggatggat atgagatggg a 21  
  
 40 <210> 40  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
 <400> 40  
 cgctatgaga cctcactgaa t 21  
  
 <210> 41  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
 <400> 41  
 cgtggactct tcggagaact t        21  
  
 5    <210> 42  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 10   <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
      <400> 42  
      acctgatgaa tatctgtact a       21  
  
      <210> 43  
      <211> 21  
 15   <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
      <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
      <400> 43  
 20   cctgaggagt tcatcagcct t       21  
  
      <210> 44  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
 25   <220>  
      <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
      <400> 44  
      cgctatgaga cctcactgaa t       21  
  
      <210> 45  
 30   <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
      <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
      <400> 45  
 35   acctgatgaa tatctgtact a       21  
  
      <210> 46  
      <211> 21  
      <212> ADN  
 40   <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
      <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
      <400> 46  
      caggatggat atgagatggg a       21  
  
      <210> 47  
 45   <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 50   <223> Secuencia diana E2f1 ADN

<400> 47  
 cgtggactct tcggagaact t        21  
  
 <210> 48  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ADN  
  
 <400> 48  
 10 acctcttcga ctgtgacttt g        21  
  
 <210> 49  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ADN  
  
 <400> 49  
 ccactctata agcagggcta a        21  
  
 <210> 50  
 20 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ADN  
  
 25 <400> 50  
 gcctatgtga cttaccagga t        21  
  
 <210> 51  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ADN  
  
 <400> 51  
 gcagacagtg attgccgtca a        21  
  
 35 <210> 52  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 40 <223> Secuencia diana E2f2 ADN  
  
 <400> 52  
 ccgagggcca agttgtgcga t        21  
  
 <210> 53  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ADN  
  
 <400> 53  
 50 cagcgatctc ttcgactcct a        21

<210> 54  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ADN

<400> 54  
 tccgtgctgt tggcaactt a 21

10 <210> 55  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ADN

15 <400> 55  
 gaggacaacc tgcagatata t 21

<210> 56  
 <211> 21  
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ADN

<400> 56  
 gtacgggtga ggagtgata a 21

25 <210> 57  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN

30 <400> 57  
 cccgctttac tcttcaggaa t 21

<210> 58  
 <211> 21  
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN

<400> 58  
 cctcattaag aagaagtcta a 21

<210> 59  
 <211> 21  
 <212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN

<400> 59  
 ccaaactgtt atagttgtga a 21

<210> 60  
 <211> 21  
 <212> ADN

50

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN  
 <400> 60  
 5 cctgactcaa tagagagcct a 21  
 <210> 61  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN  
 <400> 61  
 ccaactcagg acatagcgat t 21  
 <210> 62  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN  
 <400> 62  
 20 acgcggtatg atacgtctct t 21  
 <210> 63  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN  
 <400> 63  
 agatcctcac cacgaacct t 21  
 <210> 64  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN  
 <400> 64  
 gactcatgt gtagtgatt a 21  
 <210> 65  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN  
 <400> 65  
 45 acgaagtcca gatagtcca a 21  
 <210> 66  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>

<223> Secuencia diana E2f3 ADN  
 <400> 66  
 ccaacctaga aggaccgttt g 21

5 <210> 67  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ADN

10 <400> 67  
 gtctttgagg tctgctaata t 21

<210> 68  
 <211> 21  
 <212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ADN

<400> 68  
 caagagtgcg ctgaccatcc a 21

20 <210> 69  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Secuencia diana H-ras ADN

<400> 69  
 agaggattcc taccggaagc a 21

<210> 70  
 <211> 21  
 <212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ADN

<400> 70  
 gaggattcct accggaagca c 21

35 <210> 71  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Secuencia diana H-ras ADN

<400> 71  
 aagagtggc tgaccatcca c 21

<210> 72  
 <211> 21  
 <212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ADN

50 <400> 72

gacgtgcctg ttggacatcc t 21  
 <210> 73  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ADN  
 <400> 73  
 tggctgcacg cactgtggaa t 21  
 10 <210> 74  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Secuencia diana H-ras ADN  
 <400> 74  
 cctgttgac atcctggata 20  
 <210> 75  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ADN  
 <400> 75  
 25 ccaggaggag tacagcgcca t 21  
 <210> 76  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ADN  
 <400> 76  
 gcctgttga catcctggat a 21  
 <210> 77  
 35 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ADN  
 40 <400> 77  
 caagagtgcg ctgacatcc a 21  
 <210> 78  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ADN  
 <400> 78  
 agaggattcc taccggaagc a 21  
 50 <210> 79

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia diana H-ras ADN  
  
 <400> 79  
 cggaagcagg tggcattga t 21  
  
 <210> 80  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ADN  
  
 <400> 80  
 15 cagttgagac cttctaattg g 21  
  
 <210> 81  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ADN  
  
 <400> 81  
 cctcgtttct acacagagaa a 21  
  
 <210> 82  
 25 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ADN  
  
 30 <400> 82  
 gatgccttct atacattag t 21  
  
 <210> 83  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ADN  
  
 <400> 83  
 aggactctga agatgtacct a 21  
  
 40 <210> 84  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Secuencia diana K-ras ADN  
  
 <400> 84  
 tagttggagc tggtgcgta g 21  
  
 <210> 85  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ADN  
  
 <400> 85  
 cctacaggaa gcaagtagta a        21  
  
 5    <210> 86  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Ras ADN  
  
 <400> 86  
 gaaacctgtt tggtagcat a        21  
  
 <210> 87  
 <211> 21  
 15   <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Ras ADN  
  
 <400> 87  
 20   cagtgccatg agagaccaat a       21  
  
      <210> 88  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
 25   <220>  
      <223> Secuencia diana N-Ras ADN  
  
      <400> 88  
      caagagttac gggattccat t       21  
  
      <210> 89  
 30   <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
      <220>  
      <223> Secuencia diana N-Ras ADN  
  
 35   <400> 89  
      cagtgccatg agagaccaat a       21  
  
      <210> 90  
      <211> 21  
      <212> ADN  
 40   <213> Secuencia Artificial  
  
      <220>  
      <223> Secuencia diana N-Ras ADN  
  
      <400> 90  
      gaaacctgtt tggtagcat a       21  
  
 45   <210> 91  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia Artificial  
  
      <220>  
 50   <223> Secuencia diana N-Ras ADN

<400> 91  
 cgcaactgaca atccagctaa t      21

5 <210> 92  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana N-Ras ADN

10 <400> 92  
 ccatcaataa tagcaagta t      21

<210> 93  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

<400> 93  
 caguugaaac acaaacuuga a      21

20 <210> 94  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

25 <400> 94  
 ccuaaagua aacugccuca a      21

<210> 95  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

<400> 95  
 caggaacuau gaccucgacu a      21

35 <210> 96  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 40 <223> secuencia diana c-Myc ARN

<400> 96  
 gcuucaccaa caggaacuau g      21

<210> 97  
 <211> 21  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

<400> 97  
 50 acugaaagau uuagccauaa u      21

<210> 98  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

<400> 98  
 ccagaggagg aacgagcuaa a 21

10 <210> 99  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

15 <400> 99  
 uacggaacuc uugugcguaa g 21

<210> 100  
 <211> 21  
 <212> ARN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

<400> 100  
 ccugagacag aucagcaaca a 21

25 <210> 101  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

30 <400> 101  
 aucaucaucc aggacuguau g 21

<210> 102  
 <211> 21  
 <212> ARN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia diana c-Myc ARN

<400> 102  
 acucggugca gccguauuuc u 21

<210> 103  
 <211> 21  
 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ARN

<400> 103  
 ccugugccac uaaacuacau u 21

<210> 104  
 <211> 21  
 <212> ARN

50

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ARN  
 <400> 104  
 5 cgaggacauc uggaagaaau u 21  
 <210> 105  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ARN  
 <400> 105  
 cauuggcucu ucucaagcuc u 21  
 <210> 106  
 15 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ARN  
 20 <400> 106  
 caggaacuac gccuccauca u 21  
 <210> 107  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ARN  
 <400> 107  
 cccaagcgac ucggguaagg a 21  
 30 <210> 108  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Secuencia diana L-Myc ARN  
 <400> 108  
 uggcgcuuag agaggacaau a 21  
 <210> 109  
 <211> 21  
 40 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ARN  
 <400> 109  
 uguugguaaa caguuuggaa a 21  
 <210> 110  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>

<223> Secuencia diana L-Myc ARN  
 <400> 110  
 ucuccaguug gcuuuacuuu a 21  
 5 <210> 111  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana L-Myc ARN  
 10 <400> 111  
 gaggcuuaga gauagacaau c 21  
 <210> 112  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 112  
 cagcagcagu ugcuaaagaa a 21  
 20 <210> 113  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 113  
 gcgucgcaga aaccacaaca u 21  
 <210> 114  
 <211> 21  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 114  
 35 cugagcgauu cagaugauga a 21  
 <210> 115  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 115  
 gccaguauua gacuggaagu u 21  
 <210> 116  
 45 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 50 <400> 116

cggacgaaga ugacuucuaac u 21  
 <210> 117  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 117  
 caccuccaug acagcguaa a 21  
 10 <210> 118  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 118  
 cuucuacccg gacgaagaug a 21  
 <210> 119  
 <211> 21  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 119  
 25 agacagcagc aguugcuaaa g 21  
 <210> 120  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 120  
 cauaccuaag uacuguaaa a 21  
 <210> 121  
 35 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 40 <400> 121  
 ucggacuugc uagacgcuuc u 21  
 <210> 122  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
 <400> 122  
 acguccgcuc aagaguguca u 21  
 50 <210> 123

<211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
  
 <400> 123  
 cacggagaug cugcuugaga a 21  
  
 <210> 124  
 <211> 21  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana N-Myc ARN  
  
 <400> 124  
 15 acgugccgga guugguaaag a 21  
  
 <210> 125  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 125  
 uaacugcacu uucggccuu u 21  
  
 <210> 126  
 25 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 126  
 30 cauccagcuc auugccaaga a 21  
  
 <210> 127  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 127  
 uaagagcaaa caaggcccga u 21  
  
 40 <210> 128  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 128  
 accucuucga cugugacuuu g 21  
  
 <210> 129  
 <211> 20  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 129  
 acaucaccaa cguccuugag 20  
  
 5 <210> 130  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 10 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 130  
 cuacucagcc uggagcaaga a 21  
  
 <210> 131  
 <211> 21  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 131  
 20 caggauggau augagauggg a 21  
  
 <210> 132  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 132  
 cgcuaugaga ccucacugaa u 21  
  
 <210> 133  
 30 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 35 <400> 133  
 cguggacucu ucggagaacu u 21  
  
 <210> 134  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN  
  
 <400> 134  
 accugaugaa uaucuguacu a 21  
  
 45 <210> 135  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Secuencia diana E2f1 ARN

<400> 135  
 ccugaggagu ucaucagccu u 21

5 <210> 136  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN

10 <400> 136  
 cgcuaugaga ccucacugaa u 21

<210> 137  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN

<400> 137  
 accugaugaa uaucuguacu a 21

20 <210> 138  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN

25 <400> 138  
 caggauggau augagauggg a 21

<210> 139  
 <211> 21  
 <212> ARN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f1 ARN

<400> 139  
 cguggacucu ucggagaacu u 21

35 <210> 140  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 40 <223> Secuencia diana E2f1 ARN

<400> 140  
 accucuucga cugugacuuu g 21

<210> 141  
 <211> 21  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ARN

<400> 141  
 50 ccacucuaua agcagggcua a 21

<210> 142  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ARN

<400> 142  
 gccuauguga cuuaccagga u 21

10 <210> 143  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ARN

15 <400> 143  
 gcagacagug auugccguca a 21

<210> 144  
 <211> 21  
 <212> ARN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ARN

<400> 144  
 ccgagggcca aguugugcga u 21

25 <210> 145  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ARN

30 <400> 145  
 cagcgaucuc uucgacuccu a 21

<210> 146  
 <211> 21  
 <212> ARN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ARN

<400> 146  
 uccgugcugu uggcaacuuu a 21

<210> 147  
 <211> 21  
 <212> ARN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ARN

<400> 147  
 gaggacaacc ugcagauaua u 21

<210> 148  
 <211> 21  
 <212> ARN

50

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f2 ARN  
 <400> 148  
 5 guacggguga ggaguggau a 21  
 <210> 149  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 149  
 cccgcuuuac ucuucaggaa u 21  
 <210> 150  
 15 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 20 <400> 150  
 ccucauuuag aagaagucua a 21  
 <210> 151  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 151  
 ccaaacuguu auaguuguga a 21  
 30 <210> 152  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 152  
 ccugacucua uagagagccu a 21  
 <210> 153  
 <211> 21  
 40 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 153  
 45 ccaacucagg acauagcgau u 21  
 <210> 154  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>

<223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 154  
 acgcgguaug auacgucucu u 21  
 5 <210> 155  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 10 <400> 155  
 agauccucac cacgaacacu u 21  
 <210> 156  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 156  
 gacuucaugu guaguugauu a 21  
 20 <210> 157  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 157  
 acgaagucca gauaguccaa a 21  
 <210> 158  
 <211> 21  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 158  
 35 ccaaccuaga aggaccguuu g 21  
 <210> 159  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Secuencia diana E2f3 ARN  
 <400> 159  
 gucuuugagg ucugcuaaua u 21  
 <210> 160  
 45 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
 50 <400> 160

caagagugcg cugaccaucc a 21  
 <210> 161  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
 <400> 161  
 agaggauucc uaccggaagc a 21  
 10 <210> 162  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
 <400> 162  
 gaggauuccu accggaagca c 21  
 <210> 163  
 <211> 21  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
 <400> 163  
 25 aagagugcg ugaccaucca c 21  
 <210> 164  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
 <400> 164  
 gacgugccug uuggacaucc u 21  
 <210> 165  
 35 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
 <400> 165  
 40 uggcugcacg cacuguggaa u 21  
 <210> 166  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
 <400> 166  
 ccuguuggac auccuggaua 20  
 50 <210> 167

<211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
  
 <400> 167  
 ccaggaggag uacagcgcca u 21  
  
 <210> 168  
 <211> 21  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
  
 <400> 168  
 15 gccuguugga cauccuggau a 21  
  
 <210> 169  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
  
 <400> 169  
 caagagugcg cugaccaucc a 21  
  
 <210> 170  
 25 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
  
 30 <400> 170  
 agaggauucc uaccggaagc a 21  
  
 <210> 171  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana H-ras ARN  
  
 <400> 171  
 cggaagcagg uggucuuuga u 21  
  
 40 <210> 172  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Secuencia diana K-ras ARN  
  
 <400> 172  
 caguugagac cuucuaauug g 21  
  
 <210> 173  
 <211> 21  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ARN  
  
 <400> 173  
 ccucguuuu acacagagaa a 21  
  
 5 <210> 174  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 10 <223> Secuencia diana K-ras ARN  
  
 <400> 174  
 gaugccuucu auacauuagu u 21  
  
 <210> 175  
 <211> 21  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ARN  
  
 <400> 175  
 20 aggacucuga agaaguaccu a 21  
  
 <210> 176  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ARN  
  
 <400> 176  
 uaguuggagc ugguggcgua g 21  
  
 <210> 177  
 30 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diana K-ras ARN  
  
 <400> 177  
 35 ccuacaggaa gcaaguagua a 21  
  
 <210> 178  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia diana N-ras ARN  
  
 <400> 178  
 gaaaccuguu uguuggacau a 21  
  
 45 <210> 179  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> secuencia diana N-ras ARN

<400> 179  
 cagugccaug agagaccaau a 21  
 <210> 180  
 <211> 21  
 5 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> secuencia diana N-ras ARN  
 <400> 180  
 10 caagaguuac gggauuccau u 21  
 <210> 181  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> secuencia diana N-ras ARN  
 <400> 181  
 cagugccaug agagaccaau a 21  
 <210> 182  
 20 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> secuencia diana N-ras ARN  
 25 <400> 182  
 gaaaccuguu uguuggacau a 21  
 <210> 183  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> secuencia diana N-ras ARN  
 <400> 183  
 cgcacugaca auccagcuaa u 21  
 35 <210> 184  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> secuencia diana N-ras ARN  
 <400> 184  
 ccaucaauaa uagcaaguca u 21  
 <210> 185  
 <211> 58  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)  
 <400> 185  
 50 ccggcagtg aaacacaaac ttgaactcga gtccaagtt gtgttcaac tgttttg 58

## ES 2 686 129 T3

- <210> 186  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>  
<223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 186  
ccggcctgag acagatcagc aacaactcga gttgttgctg atctgtctca ggTTTTG 58
- 10 <210> 187  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- 15 <400> 187  
ccggcctgag acagatcagc aacaactcga gttgttgctg atctgtctca ggTTTTG 58
- <210> 188  
<211> 58  
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 188  
ccggccataa tgtaaactgc ctcaactcga gttgaggcag ttacattat ggTTTTG 58
- 25 <210> 189  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- 30 <400> 189  
ccggcaggaa ctatgacctc gactactcga gtagtcgagg tcatagttcc tgTTTTG 58
- <210> 190  
<211> 58  
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 190  
ccgggcttca ccaacaggaa ctatgctcga gcatagttcc tggTGTGaa gctTTTTG 58
- <210> 191  
<211> 58  
<212> ADN
- 45 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 191  
ccggactgaa agatttagcc ataactcga gattatggct aaatcttca ggTTTTG 58
- <210> 192  
<211> 58  
<212> ADN
- 50

## ES 2 686 129 T3

- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 192
- 5 cggccagag gaggaacgag ctaaactcga gtttagctcg ttctctctct ggttttg 58
- <210> 193
- <211> 58
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 193
- cggtaacgga actctgtgc gtaagctcga gcttacgcac aagagtccg tatttttg 58
- <210> 194
- <211> 58
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
- <223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 194
- 20 ccggcctgag acagatcagc aacaactcga gttgtgctg atctgtctca ggttttg 58
- <210> 195
- <211> 58
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 195
- ccggatcatc atccaggact gtatgctcga gcatacagtc ctggatgatg attttttg 58
- <210> 196
- <211> 58
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> secuencia de ADN comercial c-Myc que codifica shARN frente a cMyc (Sigma)
- <400> 196
- 35 ccggactcgg tgcagccgta ttctctcga gagaatacgc gctgcaccga gtttttg 58
- <210> 197
- <211> 57
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
- <223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)
- <400> 197
- 45 ccggcctgtg ccactaaact acattctcga gaatgtagtt tagtggcaca ggtttt 57
- <210> 198
- <211> 57
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>

ES 2 686 129 T3

<223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)

<400> 198  
 ccggcgagga catctggaag aaattctcga gaatttctc cagatgtcct cgtttt 57

5 <210> 199  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)

10 <400> 199  
 ccggcattgg ctctctcaa gctctctcga gagagcttga gaagagccaa tgtttt 57

<210> 200  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)

<400> 200  
 ccggcaggaa ctacgcctcc atcatctcga gatgatggag gcgtagtcc tgtttt 57

20 <210> 201  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 25 <223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)

<400> 201  
 ccggccaag cgactcgggt aaggactcga gtcctaccc gagtcgctg ggtttt 57

<210> 202  
 <211> 59  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)

<400> 202  
 35 ccggtggcgc ttagagagga caatactcga gtattgtcct ctctaagcgc catttttg 59

<210> 203  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)

<400> 203  
 ccggtgtgg taaacagttt ggaaactcga gttccaaac tgtttacaa catttttg 59

<210> 204  
 45 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)

50 <400> 204

## ES 2 686 129 T3

	ccggtctcca gttggcttta ctttactcga gtaaagtaaa gccaaactgga gattttttg	59
	<210> 205	
	<211> 59	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de ADN comercial L-Myc que codifica shARN frente a L-Myc (Sigma)	
	<400> 205	
	ccgggaggct tagagataga caatcctcga ggattgtcta tctctaagcc tctttttg	59
10	<210> 206	
	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)	
	<400> 206	
	ccggcagcag cagttgctaa agaaactcga gtttcttag caactgctgc tgtttt	57
	<210> 207	
	<211> 57	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)	
	<400> 207	
25	ccgggcgctc cagaaaccac aacatctcga gatgtgtgg tttctcgcac gcttttt	57
	<210> 208	
	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)	
	<400> 208	
	ccggctgagc gattcagatg atgaactcga gttcatcatc tgaatcgtc agtttt	57
	<210> 209	
35	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)	
40	<400> 209	
	ccgggccagt attagactgg aagtctcga gaactccag tctaactctg gcttttt	57
	<210> 210	
	<211> 57	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)	
	<400> 210	
	ccggcggagc aagatgactt ctactctcga gactagaagt catctcgtc cgtttt	57
50	<210> 211	

# ES 2 686 129 T3

- <211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
5 <223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)
- <400> 211  
ccggcacctc catgacagcg ctaaactcga gtttagcgct gtcattggagg tgttttg 58
- <210> 212  
<211> 58  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)
- <400> 212  
15 ccggcttcta cccggacgaa gatgactcga gtcattctcg tccgggtaga agttttg 58
- <210> 213  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>  
<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)
- <400> 213  
ccggagacag cagcagttgc taaagctcga gcttagcaaa ctgctgctgt ctttttg 58
- <210> 214  
25 <211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)
- 30 <400> 214  
ccggcatacc taagtactgt aataactcga gttattacag tacttaggta tgttttg 58
- <210> 215  
<211> 59  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)
- <400> 215  
ccggtcggac ttgctagacg cttctctcga gagaagcgtc tagcaagtcc gatttttg 59
- 40 <210> 216  
<211> 59  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
45 <223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)
- <400> 216  
ccggacgtcc gctcaagagt gtcattctcga gatgacactc ttgagcggac gtttttg 59
- <210> 217  
<211> 59  
50 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

## ES 2 686 129 T3

<220>

<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)

<400> 217

ccggcacgga gatgctgctt gagaactcga gttctcaagc agcatctccg gttttttg 59

5

<210> 218

<211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> secuencia de ADN comercial N-Myc que codifica shARN frente a N-Myc (Sigma)

<400> 218

ccggacgtgc cggagtgtt aaagactcga gtctttacca actccggcac gttttttg 59

**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vivo o ex vivo para producir nanovesículas que comprenden un oligonucleótido inhibidor que es un inhibidor de un gen o producto genético de MYC, comprendiendo dicho método:
- 5 a) introducir una secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido capaz de inhibir un gen MYC humano o producto génico, en una célula de mamífero;
- b) transfectar o transducir la célula con una construcción que comprende un gen L-Myc;
- c) mantener la célula en condiciones que permitan a la célula expresar dicho oligonucleótido inhibidor y sobreexpresar L-Myc; y
- d) obtener nanovesículas que contienen dicho oligonucleótido inhibidor de dicha célula,
- 10 donde dichas nanovesículas son vesículas derivadas de células que tienen un tamaño de menos de 500 nm.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido inhibidor es un inhibidor del gen c-Myc o producto génico.
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho oligonucleótido es ARN, preferiblemente una molécula de ARNi, opcionalmente en el que dicha secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido capaz de inhibir un factor de transcripción humano oncogénico o proto-oncogénico es una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-9 y SEQ ID NO: 185-196.
- 15 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha célula expresa una molécula diana en la superficie de la célula.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende, antes de la etapa a) o simultáneamente con la etapa a), introducir una secuencia de ADN que codifica una molécula diana para que se exprese en la superficie de la célula.
- 20 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, donde dicha molécula diana es un ligando que se une específicamente a una proteína de superficie que está sobreexpresada en células cancerosas, opcionalmente donde dicha molécula diana es el factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormona estimulante de melanocitos (MSH) o una región variable de un anticuerpo dirigido contra una proteína de superficie que se sobreexpresa en células cancerosas, o un fragmento de Fab de dicho anticuerpo.
- 25 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula es una célula humana.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa a) comprende introducir una construcción genética que comprende dicha secuencia de ADN que codifica un oligonucleótido capaz de inhibir c-Myc humano, operativamente unida a un promotor inducible, y la etapa b) comprende inducir la expresión por activación de dicho promotor inducible.
- 30