

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 811**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/US2014/070970**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15100113**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14875786 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3087182**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer utilizando agentes peptidos a base de ácido nucleico**

30 Prioridad:
23.12.2013 US 201361920289 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2020

73 Titular/es:
**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:
**ROTHMAN, JEFFREY K. y
SCHWARTZ, GARY K.**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 741 811 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

Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer utilizando agentes peptidos a base de ácido nucleico

Antecedentes de la invención

5 [0001] La industria de la salud experimenta una necesidad constante de proporcionar terapias nuevas y efectivas para tratar a los pacientes que luchan contra el cáncer. El descubrimiento de nuevas composiciones que se desvían de los enfoques quimioterapéuticos tradicionales está ayudando en el enfoque que los médicos usan para prescribir tratamientos para pacientes oncológicos. Se hace un esfuerzo particular hacia las composiciones y métodos para tratar el cáncer usando enfoques de biología molecular en lugar de enfoques químicos.

10 [0002] Hu, J. et al., Biochemistry 2007, 46 (25), 7581 divulgan conjugados peptídicos de ácido nucleico-peptido que se dirigen al ADN cromosómico para inhibir la expresión de genes.

15 [0003] WO 2008/043366 A2 describe que la administración transmembrana de un agente biológico acoplado a un dominio catiónico puede mejorarse adicionalmente mediante el acoplamiento a un dominio lipófilo tal como un ácido graso. Por lo tanto, WO 2008/043366 A2 describe compuestos de tres dominios para la administración transmembrana.

Resumen

20 [0004] La presente invención proporciona composiciones nuevas y eficaces para tratar el cáncer. Entre otras cosas, la presente invención reconoce la fuente de un problema con los tratamientos convencionales contra el cáncer y proporciona la idea de que los compuestos que se dirigen a la expresión del gen (por ejemplo, el oncogén), como se describe aquí, son particularmente útiles en diversos contextos para tratar el cáncer.

25 [0005] Entre otras cosas, la presente divulgación demuestra que los agentes peptídicos de ácido nucleico (PNA) que pueden dirigirse específicamente a los genes pueden permitir tratamientos mejorados para el cáncer. En algunas realizaciones, el uso de agentes peptídicos de ácido nucleico permitirá métodos mejorados para suprimir y tratar el cáncer en un entorno clínico. Además, los ácidos nucleicos peptídicos con restos terminales catiónicos y / o hidrófobos que mejoran la solubilidad dentro de las membranas celulares pueden ser más efectivos para cruzar las membranas celulares que los agentes de tipo PNA anteriores y ofrecer estabilización hacia la diana cromosómica aniónica.

30 [0006] Los agentes de PNA son herramientas prometedoras en la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos para tratar enfermedades como el cáncer. La presente divulgación proporciona agentes de PNA mejorados, así como tecnologías para diseñar, identificar, caracterizar y / o usarlos, y composiciones que los incluyen.

35 [0007] Entre otras cosas, la presente invención abarca el reconocimiento de que una necesidad no satisfecha en el uso de fármacos basados en PNA disponibles es el suministro exitoso de agentes a través de las membranas celulares al gen diana. Por ejemplo, la capacidad de cruzar las membranas celulares está mediada por péptidos de administración catiónicos / hidrófobos. Entre otras cosas, la presente invención describe agentes de PNA cuyas propiedades fisicoquímicas contribuyen a una administración de fármaco mejorada a través de las membranas celulares (por ejemplo, en relación con los agentes de PNA disponibles).

40 [0008] Por ejemplo, la presente divulgación demuestra que los extremos cargados catiónicamente en los agentes de PNA mejoran la capacidad de dirigirse a regiones no promotoras de genes, que están menos abiertas y expuestas en comparación con las regiones promotoras. Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, la presente descripción propone que la estabilización de los extremos de PNA cargados catiónicamente derivatizados con lisina contra el ADN aniónico mejora la cinética de unión de un PNA a los objetivos. Estas modificaciones terminales permiten la estabilización de los extremos de los conjugados hacia los ésteres de fosfato aniónicos cromosómicos debido a la interacción catiónico-aniónica como se muestra en la Figura 1A. Esto ayuda a las propiedades de invasión de la hebra de un PNA y le permite desplazar la hebra complementaria de su objetivo oncogénico. De acuerdo con el modelo helicoidal estadístico Zimm-Bragg, la estabilización de las porciones (terminales) más lábiles de la configuración hacia la formación de la hélice es el paso más desfavorecido entrópicamente. Después de la estabilización del extremo / extremos, la formación de hélices es comparativamente inmediata. Esto también es consistente con el modelo de cadena estocástica.

55 [0009] Los agentes de PNA de la presente divulgación se modifican en relación con los agentes de PNA tradicionales mediante el uso de péptidos catiónicos / hidrófobos; en algunas realizaciones, dichos agentes de PNA modificados muestran una administración mejorada a través de las membranas celulares en relación con la observada con agentes

de PNA de otro modo comparables que no incluyen tales péptidos catiónicos / hidrófobos. De nuevo, sin querer limitarse a ninguna teoría particular, la presente descripción propone que los péptidos terminales hidrófobos y catiónicos juntos facilitan el transporte pasivo de agentes de PNA de la invención a través de membranas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones particulares, los términos de la palmitoil lisina hidrófobos se activan juntos por exclusión de disolvente, y el conjugado de PNA-péptido se estabiliza de manera intramolecular adicionalmente por bases de nucleósidos con interacciones π . En algunas realizaciones, una cadena de PNA-péptido se compacta (es decir, muestra un radio de giro reducido) a través de tales interacciones, lo que permite que penetre más fácilmente en una membrana (por ejemplo, una bicapa lipídica). Además, se plantea la hipótesis de que las interacciones catiónico-aniónicas entre los agentes de PNA de la presente invención y la membrana celular de fosfolípidos también facilitan la inserción del agente de PNA en la membrana.

[0010] Con respecto a los agentes de PNA, existe un equilibrio termodinámico entre la unión estable dentro de una membrana celular y la disociación de la membrana. Sin desear estar limitado por ninguna teoría particular, se prevé que las modificaciones de los agentes de PNA de la presente invención alivien la barrera cinética para la inserción de agentes de PNA en la membrana, de modo que el equilibrio mencionado anteriormente se logre más rápidamente. Esto, a su vez, acelera el transporte transmembrana como se muestra en la Figura 1B.

[0011] Sin desear estar limitado por ninguna teoría particular, se contempla que un agente de PNA de la presente invención existe en un equilibrio entre los estados plegados y abiertos como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1C. El estado plegado se presta bien para la inserción de la membrana celular, y el estado ovillo abierto se presta bien para la asociación helicoidal con dianas cromosómicas para una transición de hélice-ovillo mejor facilitada.

[0012] La técnica ha desarrollado una variedad de estrategias para transportar oligonucleótidos a través de las membranas celulares. La presente invención proporciona sistemas mejorados, que permiten un transporte mejorado de los derivados de PNA proporcionados a través de las membranas celulares y el suministro intracelular, y además facilitan la unión de los agentes de PNA y la selección de regiones de ADN menos expuestas.

[0013] Las realizaciones de la presente invención abarcan el descubrimiento sorprendente de que los agentes de ácido nucleico peptídicos con extremos modificados como se describen en el presente documento pueden cruzar mejor las membranas celulares y unirse a genes diana. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, los agentes de ácido nucleico peptídicos modificados específicos para mutaciones BRAF pueden suprimir la transcripción y finalmente la traducción de la proteína BRAF mutante, así como reducir la viabilidad de las células que expresan la proteína mutante.

[0014] Las realizaciones de la presente invención abarcan el descubrimiento sorprendente de que los agentes de ácido nucleico peptídicos pueden unirse a genes asociados con un estado de enfermedad.

[0015] En el presente documento se describen agentes de PNA que comprenden: un resto de PNA; un primer resto catiónico o hidrófobo en un primer extremo del resto de PNA; y un segundo resto catiónico o hidrófobo en un segundo extremo del resto de PNA. Además, se describe en el presente documento que el primer resto catiónico puede ser o puede comprender un péptido. El primer péptido catiónico comprende o consiste en residuos de lisina. Al menos un residuo de lisina comprende un resto de cadena lateral de palmitoil. En algunas realizaciones, el primer péptido catiónico comprende aminas.

[0016] La invención proporciona agentes de PNA que comprenden: un resto de PNA; un primer resto catiónico y un primer resto hidrófobo en un primer extremo del resto de PNA; y un segundo resto catiónico y un segundo resto hidrófobo en un segundo extremo del resto de PNA. El primer resto catiónico e hidrófobo es un péptido. El segundo resto catiónico e hidrófobo es un péptido. El primer y segundo péptido catiónico comprende uno o más residuos de lisina. El primer y segundo péptido hidrófobo comprende uno o más residuos de lisina. Se describe en la presente memoria que, al menos, un resto de lisina puede comprender un resto de cadena lateral de palmitoil. Al menos un residuo de lisina en cada extremo del resto de PNA comprende un resto de cadena lateral de palmitoil. En algunas realizaciones, el primer y / o segundo péptido catiónico y / o hidrófobo comprenden aminas.

[0017] En algunas realizaciones, la palmitoil lisina no se une al resto de PNA directamente, sino a través de uno o más aminoácidos adicionales.

[0018] En algunas realizaciones, el agente de PNA tiene una secuencia que no forma bucles de horquilla. En algunas realizaciones, el agente de PNA tiene una secuencia que tiene una tendencia a no formar bucles de horquilla. En

- 5 algunas realizaciones, el agente de PNA tiene una secuencia que contiene menos de 60% de purinas. En algunas realizaciones, el primer y / o segundo resto catiónico y / o hidrófobo es un resto de direccionamiento en el que los restos catiónicos terminales se alinean más eficazmente con la fosforribosa aniónica de ADN. Esto les permite una mayor probabilidad estadística de encontrar el ácido nucleico con la secuencia a la que están dirigidos. Los residuos hidrofóbicos / catiónicos terminales facilitan más efectivamente el derivado de PNA a través de las membranas celulares. Los extremos probablemente se asocian intramolecularmente por "exclusión de disolventes hidrófobos", lo que aumenta la probabilidad estadísticamente alta de que los términos estén dentro de la proximidad entre sí. El segundo resto catiónico o hidrófobo es un péptido catiónico e hidrófobo.
- 10 **[0019]** En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento está en el extremo N del agente de PNA. En algunas realizaciones, el péptido catiónico está en el extremo C del agente de PNA. En algunas realizaciones, el primer resto catiónico o hidrófobo es un resto de direccionamiento en el sentido de que los restos catiónicos terminales se alinean más eficazmente con la fosforribosa aniónica de ADN para permitir una mayor probabilidad estadística de encontrar el ácido nucleico con la secuencia a la que están dirigidos y es unido al terminal N del agente de PNA; y el segundo resto catiónico o hidrófobo es o comprende un péptido catiónico que está unido en el extremo C del agente de PNA.
- 15 **[0020]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA comprenden una secuencia que se dirige a un gen. En algunas realizaciones, los agentes de PNA comprenden una secuencia que se dirige a una secuencia de 13-20 nucleótidos de un gen con una complementariedad del 75% o mayor. En algunas realizaciones, los agentes de PNA comprenden un ácido nucleico cuya longitud es de al menos 14, 15, 16, 17, o 18 nucleótidos y / o la complementariedad es de al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%. En algunas realizaciones, el agente de PNA tiene una secuencia que se dirige a una región no promotora de un gen. En algunas realizaciones, el gen es un oncogén. En algunas realizaciones, el oncogén incluye un elemento de secuencia mutante y el agente de PNA tiene una secuencia que se dirige a un sitio que comprende o consiste en el elemento de secuencia mutante.
- 20 **[0021]** En algunas realizaciones, el componente de PNA incorpora una secuencia de sentido (ARNm) de un gen diana.
- 25 **[0022]** En algunas realizaciones, el agente de PNA está dirigido a una región de un oncogén BRAF que comprende una mutación correspondiente a una mutación V600E en una proteína BRAF. En algunas realizaciones, el agente de PNA está dirigido a una región de un gen Gnaq que comprende una mutación correspondiente a una mutación Q209L en una proteína Gnaq.
- 30 **[0023]** En algunas realizaciones, el agente de PNA está dirigido a una región que comprende una unión de translocación de un oncogén. En algunas realizaciones, el agente de PNA está dirigido a una región de una translocación MYB-NFIB que comprende una unión de genes MYB y NFIB o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de PNA está dirigido a una región de una translocación FUS-CHOP que comprende una unión de genes FUS y CHOP o fragmentos de los mismos.
- 35 **[0024]** En algunas realizaciones, el agente de PNA tiene una secuencia que se dirige a un sitio en un gen, cuyo agente de PNA se caracteriza porque cuando un sistema que comprende una célula que expresa el gen se expone al agente de PNA, la expresión del gen se reduce por una cantidad dentro del rango de 20% a 90% de supresión de la actividad normal cuando el agente de PNA está presente en comparación con las condiciones comparables de otro modo cuando está ausente. En algunas realizaciones, el agente de PNA tiene una secuencia que se dirige a un sitio en un gen, cuyo agente de PNA se caracteriza porque cuando un sistema que comprende una célula que expresa el gen se expone al agente de PNA, la expresión del gen se reduce por una cantidad dentro del rango de 20% a 90% cuando el agente de PNA está presente en comparación con otras condiciones comparables cuando está ausente. En algunas realizaciones, el producto proteico se reduce a menos del 50% de expresión. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un animal. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un primate. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un ser humano. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un ratón. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un ratón modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un ratón BRAF. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende la célula en cultivo.
- 40 **[0025]** En algunas realizaciones, el resto de PNA tiene una longitud dentro del intervalo de 13-18 nucleótidos. Los restos de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos. Las fracciones de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos N y C. En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen una longitud de péptido de administración dentro del intervalo de 8-12 aminoácidos. En algunas realizaciones, los conjugados de PNA-péptido se estabilizan intramolecularmente por bases de nucleósidos que interactúan en pi. En algunas realizaciones, el radio de giro del agente de PNA se reduce dentro del intervalo del 25% al 50%. En algunas realizaciones, los agentes de PNA, cuando se ponen en contacto con una membrana celular, cruzan la membrana 10 veces más que los agentes de PNA de
- 45 **[0025]** En algunas realizaciones, el resto de PNA tiene una longitud dentro del intervalo de 13-18 nucleótidos. Los restos de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos. Las fracciones de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos N y C. En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen una longitud de péptido de administración dentro del intervalo de 8-12 aminoácidos. En algunas realizaciones, los conjugados de PNA-péptido se estabilizan intramolecularmente por bases de nucleósidos que interactúan en pi. En algunas realizaciones, el radio de giro del agente de PNA se reduce dentro del intervalo del 25% al 50%. En algunas realizaciones, los agentes de PNA, cuando se ponen en contacto con una membrana celular, cruzan la membrana 10 veces más que los agentes de PNA de
- 50 **[0025]** En algunas realizaciones, el resto de PNA tiene una longitud dentro del intervalo de 13-18 nucleótidos. Los restos de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos. Las fracciones de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos N y C. En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen una longitud de péptido de administración dentro del intervalo de 8-12 aminoácidos. En algunas realizaciones, los conjugados de PNA-péptido se estabilizan intramolecularmente por bases de nucleósidos que interactúan en pi. En algunas realizaciones, el radio de giro del agente de PNA se reduce dentro del intervalo del 25% al 50%. En algunas realizaciones, los agentes de PNA, cuando se ponen en contacto con una membrana celular, cruzan la membrana 10 veces más que los agentes de PNA de
- 55 **[0025]** En algunas realizaciones, el resto de PNA tiene una longitud dentro del intervalo de 13-18 nucleótidos. Los restos de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos. Las fracciones de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos N y C. En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen una longitud de péptido de administración dentro del intervalo de 8-12 aminoácidos. En algunas realizaciones, los conjugados de PNA-péptido se estabilizan intramolecularmente por bases de nucleósidos que interactúan en pi. En algunas realizaciones, el radio de giro del agente de PNA se reduce dentro del intervalo del 25% al 50%. En algunas realizaciones, los agentes de PNA, cuando se ponen en contacto con una membrana celular, cruzan la membrana 10 veces más que los agentes de PNA de
- 60 **[0025]** En algunas realizaciones, el resto de PNA tiene una longitud dentro del intervalo de 13-18 nucleótidos. Los restos de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos. Las fracciones de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos N y C. En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen una longitud de péptido de administración dentro del intervalo de 8-12 aminoácidos. En algunas realizaciones, los conjugados de PNA-péptido se estabilizan intramolecularmente por bases de nucleósidos que interactúan en pi. En algunas realizaciones, el radio de giro del agente de PNA se reduce dentro del intervalo del 25% al 50%. En algunas realizaciones, los agentes de PNA, cuando se ponen en contacto con una membrana celular, cruzan la membrana 10 veces más que los agentes de PNA de

referencia que carecen de uno o ambos restos hidrófobos / catiónicos terminales. En algunas realizaciones, la supresión de genes es aproximadamente una magnitud más efectiva al emplear residuos de Lys (palmitoil) -Lys-Lys catiónicos / hidrófobos en ambos extremos en comparación con un motivo de péptido-PNA de administración estándar.

- 5 **[0026]** Se describe en el presente documento un método para tratar o reducir el riesgo de una enfermedad, trastorno o afección que comprende: administrar a un sujeto susceptible a la enfermedad, trastorno o afección en el que se proporciona un agente de PNA. En algunas realizaciones, el sujeto padece o es susceptible de cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de melanoma, melanoma ocular y / o sarcoma.
- 10 **[0027]** Además, en el presente documento se describen métodos para reducir la expresión de un gen diana en una célula que comprende: poner en contacto una célula en la que la diana se expresa con al menos un agente de PNA; determinar un nivel o actividad del objetivo en la célula cuando el agente de PNA está presente en comparación con un nivel de referencia objetivo o actividad observada en condiciones de otro modo comparables cuando está ausente; y clasificar el al menos un agente de PNA como un inhibidor objetivo si el nivel o la actividad del objetivo se reduce significativamente cuando el agente de PNA está presente en comparación con el nivel o actividad de referencia objetivo.
- 15 **[0028]** En el presente documento se describe adicionalmente un método para identificar y / o caracterizar agentes de PNA para inhibición de diana que comprende: poner en contacto un sistema en el que se expresa una diana con al menos un agente de PNA; determinar un nivel o actividad del objetivo en el sistema cuando el agente de PNA está presente en comparación con un nivel de referencia objetivo o actividad observada en condiciones comparables cuando está ausente; y clasificar el al menos un agente de PNA como un inhibidor objetivo si el nivel o la actividad del objetivo se reduce significativamente cuando el agente de PNA está presente en comparación con el nivel o actividad de referencia objetivo.
- 20 **[0029]** Cualquiera de los métodos descritos en este documento puede incluir la administración o el uso de cualquiera de los agentes de PNA descritos en este documento.
- 25 **[0030]** En algunas realizaciones, el nivel o actividad del objetivo comprende un nivel de ARNm objetivo. En algunas realizaciones, el nivel o actividad de la diana comprende un nivel de proteína diana. En algunas realizaciones, el sistema comprende un sistema *in vitro*. En algunas realizaciones, el sistema comprende un sistema *in vivo*. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende células.
- 30 **[0031]** En algunas realizaciones, el nivel o actividad del objetivo corresponde a la viabilidad celular. En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o la actividad del objetivo corresponde a una disminución de más del 90% en la viabilidad de las células tumorales.
- 35 **[0032]** En algunas realizaciones, las células comprenden células cancerosas. En algunas realizaciones, el sistema comprende células en cultivo celular. En algunas realizaciones, las células en cultivo celular comprenden células de tipo salvaje BRAF. En algunas realizaciones, las células de tipo salvaje BRAF comprenden células C918. En algunas realizaciones, las células en cultivo celular comprenden células de melanoma BRAF V600E. En algunas realizaciones, las células de melanoma BRAF V600E se seleccionan de células de melanoma uveal OCM1A y / o células de melanoma cutáneo SK-MEL 7.
- 40 **[0033]** En algunas realizaciones, el sistema es o comprende tejido. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un organismo. En algunas realizaciones, el nivel o actividad del objetivo corresponde a la supervivencia del organismo. En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo comprende un aumento de más del 50% en la supervivencia del organismo.
- 45 **[0034]** En algunas realizaciones, el organismo comprende un ratón. En algunas realizaciones, el ratón comprende un ratón BRAF. En algunas realizaciones, el ratón comprende un ratón BRAF V600E.
- 50 **[0035]** En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo comprende una reducción de más del 30% de la actividad objetivo. En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo comprende más del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60 %, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de reducción de los niveles objetivo. En algunas formas de realización, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo comprende más de dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces, quince veces, veinte veces,
- 55

cuarenta veces, cincuenta veces, sesenta veces, setenta veces, ochenta veces, noventa veces, cien veces, doscientas veces, trescientas veces, cuatrocientas veces, quinientas veces, seiscientas veces, setecientas veces, ochocientas veces, novecientas veces, mil veces, dos mil veces, tres mil veces, cuatro mil veces, cinco mil veces, seis mil veces, siete mil veces, ocho mil veces, nueve mil veces, diez mil veces o más. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es una referencia histórica. En algunas realizaciones, la referencia histórica se registra en un medio tangible y / o legible por computadora.

[0036] En algunas realizaciones, el objetivo es una región que comprende una mutación puntual en un oncogén. En algunas realizaciones, la diana es una región de un oncogén BRAF que comprende una mutación correspondiente a una mutación V600E en una proteína BRAF. En algunas realizaciones, el objetivo es una región de un gen Gnaq que comprende una mutación correspondiente a una mutación Q209L en una proteína Gnaq.

[0037] En algunas realizaciones, el objetivo es una región que comprende una unión de translocación de un oncogén. En algunas realizaciones, el objetivo es una translocación MYB-NFIB que comprende una unión de genes MYB y NFIB o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, el objetivo es una translocación FUS-CHOP que comprende una unión de genes FUS y CHOP o fragmentos de los mismos.

[0038] En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el agente de PNA y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la administración directa en un tejido diana. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración parenteral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración intradérmica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración transdérmica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración por inhalación.

[0039] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es o comprende un líquido. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es o comprende un sólido.

[0040] Las características y ventajas adicionales de la invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras, definiciones, descripción detallada y las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

[0041] Las Figuras que se describen a continuación, que juntas forman el Dibujo, son solo para fines ilustrativos, no limitativos.

Figura 1 - La Figura 1A muestra representaciones esquemáticas de un agente de PNA de acuerdo con la presente invención que se dirige al ADN. La Figura 1B muestra una representación esquemática de un agente de PNA según la presente invención que cruza una membrana celular. La Figura 1C muestra una representación esquemática de diferentes estados de un agente de PNA de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 muestra los datos de un ensayo de viabilidad celular realizado en líneas celulares de melanoma que se habían tratado con dosis crecientes de agentes de PNA indicados durante 72 horas. La viabilidad celular se midió y se calculó en relación con las células no tratadas. La Figura 2A representa la viabilidad de las líneas celulares BRAF V600E mutante (OCM1A, SK-MEL 7) y BRAF de tipo salvaje (C918) tratadas con PNA I-292-3 L2LP NHAc. La Figura 2B representa la viabilidad de las mismas líneas celulares de melanoma tratadas con PNA I-292-9 L2 NHAc. En ambas Figuras 2A y 2B, se observó la supresión de la viabilidad y especificidad celular para líneas celulares que expresan la mutación objetivo en células OCM1A y SK-MEL 7 tratadas con los derivados de PNA. La especificidad se observó a dosis más bajas en las que la viabilidad celular de las células mutantes se reduce al 20% o menos con el tratamiento de los derivados de PNA, mientras que la viabilidad celular de tipo salvaje (C918) permanece en alrededor del 100%.

La Figura 3 muestra la expresión de proteína BRAF mutante y BRAF de tipo salvaje en células tratadas con 750 nM de agente de PNA PNA I-292-3 L2LP NHAc (que incorpora un péptido de administración de NLS) durante los períodos de tiempo indicados. La Figura 3A representa la extensión de la expresión de la proteína BRAF mutante y total medida por transferencias de Western en células C918 y OCM1A. Se encontró BRAF de tipo salvaje tanto en las líneas celulares mutantes como en las de tipo salvaje, mientras que el mutante BRAF V600E solo se encontró en células mutantes. La Figura 3B representa la expresión disminuida de la proteína mutante BRAF V600E en líneas celulares OCM1A (mutante BRAF) durante 72 horas de tratamiento con un derivado de PNA. La Figura 3C no muestra una reducción significativa en la proteína de tipo salvaje BRAF total durante 72 horas en células OCM1A (mutantes) y C918 (de tipo salvaje) tratadas con I-292-3 L2LP NHAc.

La Figura 4 muestra la expresión de proteínas BRAF mutante y BRAF de tipo salvaje en células de melanoma tratadas con 750 nM de agente de PNA PNA I-292-9 L2 NHAc (que incorpora un péptido de administración de TAT). La Figura

4A representa la extensión de la expresión de la proteína BRAF mutante y total medida por transferencias de Western en células C918 y OCM1A. Se encontró BRAF de tipo salvaje tanto en las líneas celulares mutantes como en las de tipo salvaje, mientras que el mutante BRAF V600E solo se encontró en células mutantes. La Figura 4B representa la expresión disminuida de la proteína mutante BRAF V600E en líneas celulares OCM1A (mutante BRAF) durante 72 horas de tratamiento con un derivado de PNA. La Figura 4C muestra una ligera reducción en la proteína de tipo salvaje BRAF total durante 72 horas en células OCM1A (mutantes), pero no hay una reducción significativa en las células C918 (tipo salvaje) tratadas con I-292-9 L2 NHAc PNA.

La Figura 5 representa la expresión de ARNm en células de tipo salvaje para BRAF (C918) y líneas celulares mutantes (OCM1A y SK-Mel 7). La Figura 5A representa la expresión del ARNm de BRAF V600E mutante cuantificada por RT-PCR. La expresión de ARNm de BRAF V600E se redujo significativamente en las células OCM1A cuando se trató con el agente PNA I-292-3 L2LP NHAc. La Figura 5B representa tanto la expresión de ARNm de BRAF V600E como la expresión de ARNm de BRAF total en células SK-Mel 7 cuantificadas con RT-PCR. En las células SK-Mel 7, la expresión del ARNm de BRAF V600E disminuyó significativamente después del tratamiento con el agente PNA I-292-3 L2LP NHAc. No hubo disminución en la expresión total de ARNm de BRAF.

La Figura 6 muestra datos de estudios de modelos de ratones con xenoinjerto que emplean células OCM1A. La Figura 6A muestra una regresión del 50% del volumen del tumor después de tres dosis de 50 mg / kg de IP del agente PNA I-292-3 L2LP NHAc administrada los días 5, 17, 20 y 22. La contracción del tumor comienza a aumentar más de una semana después de la última dosis. La Figura 6B muestra que los ratones tratados no presentan efectos secundarios ya que no hubo pérdida de peso ni cambios en la actividad diaria durante toda la duración del tratamiento mostrado en la Figura 6A.

Definiciones

[0042] Agente: el término "agente" como se usa en el presente documento puede referirse a un compuesto o entidad de cualquier clase química que incluye, por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, sacáridos, lípidos, moléculas pequeñas, metales o combinaciones de los mismos. Como quedará claro a partir del contexto, en algunas realizaciones, un agente puede ser o comprender una célula u organismo, o una fracción, extracto o componente de los mismos. En algunas realizaciones, un agente es un agente o comprende un producto natural en que se encuentra y / o se obtiene de la naturaleza. En algunas realizaciones, un agente es o comprende una o más entidades que están hechas por el hombre en el sentido de que están diseñadas, diseñadas y / o producidas a través de la acción de la mano del hombre y / o no se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, un agente puede utilizarse en forma aislada o pura; en algunas realizaciones, un agente puede ser utilizado en forma cruda. En algunas realizaciones, los agentes potenciales se proporcionan como colecciones o bibliotecas, por ejemplo, que pueden analizarse para identificar o caracterizar los agentes activos dentro de ellos. Algunas realizaciones particulares de agentes que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención incluyen moléculas pequeñas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, ARNs, ARNs, híbridos de ADN / ARN, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, péptidos, miméticos de péptidos, ácidos nucleicos peptídicos, pequeñas moléculas, etc. En algunas realizaciones, un agente es o comprende un polímero. En algunas realizaciones, un agente no es un polímero y / o está sustancialmente libre de cualquier polímero. En algunas realizaciones, un agente contiene al menos un resto polimérico. En algunas realizaciones, un agente carece o está sustancialmente libre de cualquier resto polimérico.

[0043] Afinidad: como se conoce en la técnica, la "afinidad" es una medida de la estrechez con un ligando particular (por ejemplo, un polipéptido de HA) que se une a su compañero (por ejemplo, un receptor de HA). Las afinidades se pueden medir de diferentes maneras. En algunas realizaciones, la afinidad se mide mediante un ensayo cuantitativo (por ejemplo, ensayos de unión a glicano). En algunas de estas realizaciones, la concentración de la pareja de unión (por ejemplo, el receptor de HA, el glicano, etc.) puede fijarse para que esté en una concentración superior a la del ligando (por ejemplo, un polipéptido de HA) para imitar las condiciones fisiológicas (por ejemplo, la unión de HA viral a la célula). glicanos de superficie). Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, la concentración de la pareja de enlace (por ejemplo, el receptor de HA, el glicano, etc.) y / o la concentración de ligando (por ejemplo, un polipéptido de HA) puede variar. En algunas de tales realizaciones, la afinidad (por ejemplo, afinidad de unión) se puede comparar con una referencia (por ejemplo, un HA de tipo salvaje que media la infección de un ser humano) en condiciones comparables (por ejemplo, concentraciones).

[0044] Aminoácido: como se usa en este documento, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y / o sustancia que puede incorporarse en una cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general H₂N-C(H)(R)-COOH. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido natural. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético; en algunas realizaciones, un aminoácido es un d-aminoácido; en algunas realizaciones, un aminoácido es un l-aminoácido. "Aminoácido estándar" se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos estándar que se encuentran comúnmente en los péptidos naturales. "Aminoácido no estándar" se refiere a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos estándar, independientemente de si se prepara sintéticamente o se obtiene de una fuente natural. Como se usa en este documento, "aminoácido sintético" abarca aminoácidos modificados químicamente, que incluyen, entre otros, sales, derivados de aminoácidos (como amidas) y / o sustituciones. Los aminoácidos, incluidos los aminoácidos carboxi y /

o amino terminales en los péptidos, pueden modificarse por metilación, amidación, acetilación, grupos protectores y / o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la vida media circulante del péptido sin afectar adversamente su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. Los aminoácidos pueden comprender una o más modificaciones postraduccionales, como la asociación con una o más entidades químicas (por ejemplo, grupos metilo, grupos acetato, grupos acetilo, grupos fosfato, grupos formilo, grupos isoprenoides, grupos sulfato, grupos polietilenglicol, grupos lipídicos, carbohidratos restos, restos de biotina, etc.). El término "aminoácido" se usa indistintamente con "residuo de aminoácido", y puede referirse a un aminoácido libre y / o a un residuo de aminoácido de un péptido. Será evidente a partir del contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o un residuo de un péptido. Animal: como se usa en este documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a los humanos, de cualquier sexo y en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate y / o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y / o gusanos. En algunas realizaciones, el animal es susceptible a la infección por el VHC. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal manipulado genéticamente y / o un clon.

[0045] Agente anticuerpos: como se usa en este documento, el término "agente anticuerpo" se refiere a un agente que se usa específicamente a un antígeno particular. En algunas realizaciones, el término abarca cualquier polipéptido con elementos estructurales de inmunoglobulina suficientes para conferir una unión específica. Los agentes anticuerpo adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos conjugados (*es decir*, Anticuerpos conjugados o fusionados con otras proteínas, radioetiquetas, citotoxinas), Immuno-farmacéuticos modulares pequeños ("SMIPs™"), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos cameloides y fragmentos de anticuerpos. Como se usa en este documento, el término "agente de anticuerpo" también incluye anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio único de tiburón (por ejemplo, IgNAR o fragmentos de los mismos)), anticuerpos multiespecíficos (*p.ej.* anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad biológica deseada. En algunas realizaciones, el término abarca péptidos grapados. En algunas realizaciones, el término abarca uno o más peptidomiméticos de unión tipo anticuerpo. En algunas realizaciones, el término abarca una o más proteínas de armazón de unión de tipo anticuerpo. En algunas realizaciones, el término abarca monocuerpos o adnectinas. En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye uno o más elementos estructurales reconocidos por los expertos en la técnica como una región determinante de complementariedad (CDR); en algunas realizaciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una CDR (por ejemplo, al menos una CDR de cadena pesada y / o al menos una CDR de cadena ligera) que es sustancialmente idéntica a la que se encuentra en un anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque es idéntica en secuencia o contiene entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la CDR de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia porque muestra al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la referencia CDR. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia, ya que muestra al menos el 96%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la CDR de referencia. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que al menos un aminoácido dentro de la CDR incluida se elimina, agrega o sustituye en comparación con la CDR de referencia, pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es de otro modo idéntica con el de la referencia CDR. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia, ya que entre 1 y 5 aminoácidos dentro de la CDR incluida se eliminan, agregan o sustituyen en comparación con la CDR de referencia, pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la referencia CDR. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que al menos un aminoácido dentro de la CDR incluida está sustituida en comparación con la CDR de referencia, pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la de la referencia CDR. En algunas realizaciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia, ya que entre 1 y 5 aminoácidos dentro de la CDR incluida se eliminan, agregan o sustituyen en comparación con la CDR de referencia, pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es de otro modo idéntica a la referencia CDR. En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye elementos estructurales reconocidos por los expertos en la técnica como un dominio variable de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo es una proteína polipeptídica que tiene un dominio de unión que es homólogo o en gran parte homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina.

[0046] Antagonista: como se usa en este documento, el término "antagonista" se refiere a un agente que i) inhibe, disminuye o reduce los efectos de otro agente, por ejemplo, que inactiva un ácido nucleico; y / o ii) inhibe, disminuye, reduce o retrasa uno o más eventos biológicos, por ejemplo, la expresión de uno o más ácidos nucleicos o la estimulación de una o más rutas biológicas. Los antagonistas pueden ser o incluir agentes de cualquier clase química que incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas, polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, metales y / o

cualquier otra entidad que muestre la actividad inhibitoria relevante. Un antagonista puede ser directo (en cuyo caso ejerce su influencia directamente sobre el receptor) o indirecto (en cuyo caso ejerce su influencia de otra manera que no sea la unión al receptor; por ejemplo, alterando la expresión o la traducción del receptor; alterando las vías de transducción de señales que son activados directamente por el receptor, alterando la expresión, la traducción o la actividad de un agonista del receptor).

[0047] Polipéptido de anticuerpo: como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido de anticuerpo" o "anticuerpo", o "fragmento de unión a antígeno del mismo", que se pueden usar indistintamente, se refieren a polipéptidos capaces de unirse a un epítipo. En algunas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, y en algunas realizaciones, es menor que la longitud completa, pero incluye al menos un sitio de unión (que comprende al menos una, y preferiblemente al menos dos secuencias con estructura de anticuerpo "regiones variables"). En algunas realizaciones, el término "polipéptido de anticuerpo" abarca cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o en gran parte homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. En algunas realizaciones, "polipéptidos de anticuerpo" abarca polipéptidos que tienen un dominio de unión que muestra al menos el 99% de identidad con un dominio de unión a inmunoglobulina. En algunas realizaciones, "polipéptido de anticuerpo" es cualquier proteína que tiene un dominio de unión que muestra al menos un 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con una inmunoglobulina b dominio de indización, por ejemplo un dominio de unión a inmunoglobulina de referencia. Un "polipéptido de anticuerpo" incluido puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un anticuerpo que se encuentra en una fuente natural. Los polipéptidos de anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por cualquier medio disponible que incluya, por ejemplo, aislamiento de una fuente natural o biblioteca de anticuerpos, producción recombinante en o con un sistema huésped, síntesis química, etc., o combinaciones de los mismos. Un polipéptido de anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un polipéptido de anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En algunas realizaciones, un anticuerpo puede ser un miembro de la clase de inmunoglobulina IgG. Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido de anticuerpo" o "porción característica de un anticuerpo" se usan de manera intercambiable y se refieren a cualquier derivado de un anticuerpo que posee la capacidad de unirse a un epítipo de interés. En algunas realizaciones, el "polipéptido de anticuerpo" es un fragmento de anticuerpo que retiene al menos una porción significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpo de dsFv y fragmentos de Fd. Alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo puede ser un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, los polipéptidos de anticuerpos pueden ser humanizados. Los polipéptidos de anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o polipéptidos de anticuerpos (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, la rata o conejo teniendo la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

[0048] Antígeno: Un "antígeno" es una molécula o entidad a la que se une un anticuerpo. En algunas realizaciones, un antígeno es o comprende un polipéptido o porción del mismo. En algunas realizaciones, un antígeno es una porción de un agente infeccioso que es reconocido por anticuerpos. En algunas realizaciones, un antígeno es un agente que provoca una respuesta inmune; y / o (ii) un agente que está unido por un receptor de células T (por ejemplo, cuando se presenta por una molécula MHC) o por un anticuerpo (por ejemplo, producido por una célula B) cuando se expone o se administra a un organismo. En algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta humoral (por ejemplo, incluyendo la producción de anticuerpos específicos de antígeno) en un organismo; alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta celular (por ejemplo, que involucra células T cuyos receptores interactúan específicamente con el antígeno) en un organismo. Los expertos en la materia apreciarán que un antígeno particular puede provocar una respuesta inmune en uno o varios miembros de un organismo objetivo (por ejemplo, ratones, conejos, primates, humanos), pero no en todos los miembros de la especie de organismo objetivo. En algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta inmune en al menos aproximadamente el 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de los miembros de una especie de organismo objetivo. En algunas realizaciones, un antígeno se une a un anticuerpo y / o receptor de células T, y puede o no inducir una respuesta fisiológica particular en un organismo. En algunas realizaciones, por ejemplo, un antígeno puede unirse a un anticuerpo y / o a un receptor de células T *in vitro* si ocurre o no tal interacción *in vivo*. En general, un antígeno puede ser o incluir cualquier entidad química como, por ejemplo, una molécula pequeña, un ácido nucleico, un polipéptido, un carbohidrato, un lípido, un polímero distinto de un polímero biológico (por ejemplo, distinto de un ácido nucleico o polímero de aminoácido), etc. En algunas realizaciones, un antígeno es o comprende un polipéptido. En algunas realizaciones, un antígeno es o comprende un glicano. Los expertos en la materia apreciarán que, en general, un antígeno puede proporcionarse en forma aislada o pura, o alternativamente puede proporcionarse en forma cruda (por ejemplo, junto con otros materiales, por ejemplo, en un extracto tal como un extracto celular u otra preparación relativamente cruda de una fuente que contiene antígeno). En algunas realizaciones, los antígenos utilizados de acuerdo con la presente invención se proporcionan

en forma cruda. En algunas realizaciones, un antígeno es o comprende un antígeno recombinante.

5 **[0049]** Aproximadamente: como se usa en este documento, el término "aproximadamente", aplicado a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En algunas realizaciones, el término "aproximadamente" se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del estado indicado valor de referencia a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto (excepto cuando dicho número supere el 100% de un valor posible).

10 **[0050]** Biológicamente activo: como se usa en este documento, la frase "biólogicamente activo" se refiere a una característica de cualquier sustancia que tenga actividad en un sistema biológico (por ejemplo, cultivo celular, organismo, etc.). Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico en ese organismo, se considera biológicamente activa. En algunas realizaciones, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la
15 proteína o polipéptido se denomina típicamente una porción "biólogicamente activa".

[0051] Parte característica: como se usa en el presente documento, el término "parte característica" de una sustancia, en el sentido más amplio, es el que comparte cierto grado de secuencia o identidad estructural con respecto a la sustancia completa. En algunas realizaciones, una porción característica comparte al menos una característica funcional con la sustancia intacta. Por ejemplo, una "porción característica" de una proteína o polipéptido es una que contiene una extensión continua de aminoácidos, o una colección de extensiones continuas de aminoácidos, que juntas son características de una proteína o polipéptido. En algunas realizaciones, cada tramo continuo de este tipo generalmente contiene al menos 2, 5, 10, 15, 20, 50 o más aminoácidos. En general, una porción característica de una sustancia (por ejemplo, de una proteína, anticuerpo, etc.) es aquella que, además de la secuencia y / o identidad estructural especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con la sustancia intacta
20 relevante; la especificidad de unión a epítipo es un ejemplo. En algunas realizaciones, una porción característica puede ser biológicamente activa.

[0052] Terapia de combinación: el término "terapia de combinación", como se usa en el presente documento, se refiere a aquellas situaciones en las que dos o más agentes farmacéuticos diferentes para el tratamiento de la enfermedad se administran en regímenes superpuestos de modo que el sujeto se exponga simultáneamente a al menos dos agentes. En algunas realizaciones, los diferentes agentes se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la administración de un agente se superpone a la administración de al menos otro agente. En algunas realizaciones, los diferentes agentes se administran secuencialmente de manera que los agentes tienen actividad biológica
30 simultánea en un sujeto.

[0053] Entidad de detección: el término "entidad de detección", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier elemento, molécula, grupo funcional, compuesto, fragmentos de los mismos o resto que facilita la detección de un agente (por ejemplo, un anticuerpo) al que está unido. Los ejemplos de entidades de detección incluyen, pero
40 no se limitan a: varios ligandos, radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁸F, ¹⁹F, ³²S, ³⁵S, ¹³⁵I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁶⁴Cu, ¹⁸⁷Re, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹⁷⁷Lu, ⁸⁹Zr, etc.), colorantes fluorescentes (para ejemplos de colorantes fluorescentes específicos, ver más abajo), agentes quimioluminiscentes (como, por ejemplo, ésteres de acridinum, dioxetanos estabilizados y similares), agentes bioluminiscentes, nanocristales semiconductores fluorescentes inorgánicos resueltos espectralmente (es decir, puntos cuánticos),
45 nanopartículas metálicas (p. ej., oro, plata, cobre, platino, etc.), nanoclusteres, iones metálicos paramagnéticos, enzimas (para ejemplos específicos de enzimas, ver más abajo), etiquetas colorimétricas (como, por ejemplo, colorantes, coloidales, oro, y similares), biotina, dioxigenina, haptenos y proteínas para las cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

[0054] Información de diagnóstico: como se usa en este documento, la información de diagnóstico o la información de diagnóstico que se utiliza en el diagnóstico es cualquier información que sea útil para determinar si un paciente tiene una enfermedad o afección y / o para clasificar la enfermedad o afección en una categoría fenotípica o en cualquier categoría que tenga importancia con respecto al pronóstico de la enfermedad o afección, o la posible respuesta al tratamiento (ya sea tratamiento en general o cualquier tratamiento particular) de la enfermedad o afección. De manera
50 similar, el diagnóstico se refiere a proporcionar cualquier tipo de información de diagnóstico, que incluye, entre otros, si un sujeto tiene una enfermedad o afección (como cáncer), estado, estadio o característica de la enfermedad o afección como se manifiesta en el sujeto, información relacionada con la naturaleza o clasificación de un tumor, información relacionada con el pronóstico y / o información útil para seleccionar un tratamiento adecuado. La selección del tratamiento puede incluir la elección de un agente terapéutico particular (por ejemplo, quimioterapéutico) u otra
55 modalidad de tratamiento, como cirugía, radiación, etc., una opción sobre si se debe suspender o administrar el tratamiento, una opción relacionada con el régimen de dosificación (por ejemplo, frecuencia o nivel de una o más dosis
60

de un agente terapéutico particular o combinación de agentes terapéuticos), etc.

[0055] Forma de dosificación: como se usa en este documento, los términos "forma de dosificación" y "forma de dosificación unitaria" se refieren a una unidad físicamente discreta de una composición terapéutica que se administrará a un sujeto. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo (por ejemplo, un agente terapéutico). En algunas realizaciones, la cantidad predeterminada es una que se ha correlacionado con un efecto terapéutico deseado cuando se administra como una dosis en un régimen de dosificación. Los expertos en la materia apreciarán que la cantidad total de una composición terapéutica o agente administrado a un sujeto en particular está determinada por uno o más médicos a cargo y puede implicar la administración de múltiples formas de dosificación.

[0056] Régimen de dosificación: un "régimen de dosificación" (o "régimen terapéutico"), como se usa ese término en este documento, es un conjunto de dosis unitarias (típicamente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, típicamente separadas por períodos de tiempo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico dado tiene un régimen de dosificación recomendado, que puede implicar una o más dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis, cada una de las cuales está separada una de otra por un período de tiempo de la misma longitud; en algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y al menos dos períodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación está o se ha correlacionado con un resultado terapéutico deseado, cuando se administra a una población de pacientes.

[0057] Expresión: como se usa en este documento, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a uno o más de los siguientes eventos: (1) producción de una plantilla de ARN a partir de una secuencia de ADN (por ejemplo, mediante transcripción); (2) procesamiento de una transcripción de ARN (por ejemplo, mediante empalme, edición, formación de cap 5' y / o formación de extremo 3'); (3) traducción de un ARN en un polipéptido o proteína; y / o (4) modificación postraduccional de un polipéptido o proteína.

[0058] Funcional: como se usa en este documento, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la que exhibe una propiedad y / o actividad por la cual se caracteriza. Una molécula biológica puede tener dos funciones (es decir, bifuncional) o muchas funciones (es decir, multifuncional).

[0059] Gen: Como se usa en este documento, el término "gen" tiene su significado tal como se entiende en la técnica. En algunas realizaciones, el término "gen" puede incluir secuencias reguladoras de genes (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.) y / o secuencias de intrones. En algunas realizaciones, el término se refiere a ácidos nucleicos que no codifican proteínas, sino que codifican moléculas de ARN funcionales tales como ARNt, agentes inductores de ARNi, etc. De manera alternativa o adicional, en algunas realizaciones, el término "gen", como se usa en la presente solicitud, se refiere a una porción de un ácido nucleico que codifica una proteína. Si el término abarca otras secuencias (por ejemplo, secuencias no codificantes, secuencias reguladoras, etc.) quedará claro desde el contexto hasta los expertos en la técnica.

[0060] Producto génico o producto de expresión: como se usa en el presente documento, el término "producto génico" o "producto de expresión" generalmente se refiere a un ARN transcrito a partir del gen (procesamiento previo y / o posterior) o un polipéptido (modificación previa y / o posterior) codificada por un ARN transcrito a partir del gen.

[0061] Homología: como se usa en este documento, el término "homología" se refiere a la relación global entre las moléculas poliméricas, por ejemplo, entre las moléculas de polipéptidos. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas tales como los anticuerpos se consideran "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idénticas. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se consideran "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% similares.

[0062] Lisina o residuo de lisina: como se usa en el presente documento, el término "lisina" o "residuo de lisina" se refiere al residuo de aminoácido básico y sus derivados. Tales derivados incluyen aquellos residuos de lisina con modificaciones de la cadena lateral. Los derivados de lisina incluyen e-palmitoil lisina o Lys (palmitoil- (dLys)₂. Marcador: un marcador, como se usa en este documento, se refiere a un agente cuya presencia o nivel es una característica de un tumor particular o enfermedad metastásica del mismo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el término se refiere a un producto de expresión génica que es característico de un tumor particular, subclase de tumor, etapa del tumor, etc. Alternativamente o adicionalmente, en algunas realizaciones, una presencia o nivel de un marcador particular se correlaciona con la actividad (o actividad nivel) de una ruta de señalización particular, por ejemplo, que puede ser característica de una clase particular de tumores. La importancia estadística de la presencia o ausencia de un marcador puede variar dependiendo del marcador particular. En algunas realizaciones, la detección

de un marcador es altamente específico, ya que refleja una alta probabilidad de que el tumor pertenezca a una subclase particular. Dicha especificidad puede tener un coste de sensibilidad (es decir, puede producirse un resultado negativo incluso si el tumor es un tumor que se esperaría que expresara el marcador). Por el contrario, los marcadores con un alto grado de sensibilidad pueden ser menos específicos que aquellos con una sensibilidad más baja. De acuerdo con la presente invención, un marcador útil no necesita distinguir tumores de una subclase particular con 100% de precisión.

[0063] Mutante: como se usa en este documento, el término "mutante" se refiere a cualquier alteración en una secuencia de ácido nucleico (u opcionalmente genética) en comparación con su contraparte natural. Mutante también puede referirse al producto genético (como una proteína), a las células o al organismo que posee el gen mutado. Las secuencias de ácido nucleico que poseen mutaciones también pueden denominarse elementos de secuencia mutante.

[0064] Región no promotora: como se usa en el presente documento, el término "región no promotora" se refiere a aquellas secciones de genes que no son sitios de inicio de la transcripción. A diferencia de las regiones promotoras, las regiones no promotoras tienden a estar cerradas y son menos accesibles a otros elementos.

[0065] Oncogén: como se usa en este documento, el término "oncogén" se refiere a aquellos genes cuyos productos están asociados con causar cáncer, displasia, hiperplasia, etc. en un organismo. Los oncogenes de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a: ABL1, ABL2, ALK, AKT1, AKT2, ATF1, BCL11A, BCL2, BCL3, BCL6, BCR, BRAF, CARD11, CBLB, CBND1, CCND2, CCND3, CDX2, CTNNB1, DDB2, DDIT3, DDX6, DEK, EGFR, ELK4, ERBB2, ETV4, ETV6, EVI1, EWSR1, FEV, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FUS, GOLGA5, HMGA1, HMGA2, HNF1B, HNF1A, HNF1B, HNF1C, HNF1D, HNF1E, HNF1F, HNF1G, HNF1H, HNF1I, HNF1J, HNF1K, HNF1L, HNF1M, HNF1N, HNF1O, HNF1P, HNF1Q, HNF1R, HNF1S, HNF1T, HNF1U, HNF1V, HNF1W, HNF1X, HNF1Y, HNF1Z, HNF1AA, HNF1AB, HNF1AC, HNF1AD, HNF1AE, HNF1AF, HNF1AG, HNF1AH, HNF1AI, HNF1AJ, HNF1AK, HNF1AL, HNF1AM, HNF1AN, HNF1AO, HNF1AP, HNF1AQ, HNF1AR, HNF1AS, HNF1AT, HNF1AU, HNF1AV, HNF1AW, HNF1AX, HNF1AY, HNF1AZ, HNF1BA, HNF1BB, HNF1BC, HNF1BD, HNF1BE, HNF1BF, HNF1BG, HNF1BH, HNF1BI, HNF1BJ, HNF1BK, HNF1BL, HNF1BM, HNF1BN, HNF1BO, HNF1BP, HNF1BQ, HNF1BR, HNF1BS, HNF1BT, HNF1BU, HNF1BV, HNF1BW, HNF1BX, HNF1BY, HNF1BZ, HNF1CA, HNF1CB, HNF1CC, HNF1CD, HNF1CE, HNF1CF, HNF1CG, HNF1CH, HNF1CI, HNF1CJ, HNF1CK, HNF1CL, HNF1CM, HNF1CN, HNF1CO, HNF1CP, HNF1CQ, HNF1CR, HNF1CS, HNF1CT, HNF1CU, HNF1CV, HNF1CW, HNF1CX, HNF1CY, HNF1CZ, HNF1DA, HNF1DB, HNF1DC, HNF1DD, HNF1DE, HNF1DF, HNF1DG, HNF1DH, HNF1DI, HNF1DJ, HNF1DK, HNF1DL, HNF1DM, HNF1DN, HNF1DO, HNF1DP, HNF1DQ, HNF1DR, HNF1DS, HNF1DT, HNF1DU, HNF1DV, HNF1DW, HNF1DX, HNF1DY, HNF1DZ, HNF1EA, HNF1EB, HNF1EC, HNF1ED, HNF1EE, HNF1EF, HNF1EG, HNF1EH, HNF1EI, HNF1EJ, HNF1EK, HNF1EL, HNF1EM, HNF1EN, HNF1EO, HNF1EP, HNF1EQ, HNF1ER, HNF1ES, HNF1ET, HNF1EU, HNF1EV, HNF1EW, HNF1EX, HNF1EY, HNF1EZ, HNF1FA, HNF1FB, HNF1FC, HNF1FD, HNF1FE, HNF1FF, HNF1FG, HNF1FH, HNF1FI, HNF1FJ, HNF1FK, HNF1FL, HNF1FM, HNF1FN, HNF1FO, HNF1FP, HNF1FQ, HNF1FR, HNF1FS, HNF1FT, HNF1FU, HNF1FV, HNF1FW, HNF1FX, HNF1FY, HNF1FZ, HNF1GA, HNF1GB, HNF1GC, HNF1GD, HNF1GE, HNF1GF, HNF1GG, HNF1GH, HNF1GI, HNF1GJ, HNF1GK, HNF1GL, HNF1GM, HNF1GN, HNF1GO, HNF1GP, HNF1GQ, HNF1GR, HNF1GS, HNF1GT, HNF1GU, HNF1GV, HNF1GW, HNF1GX, HNF1GY, HNF1GZ, HNF1HA, HNF1HB, HNF1HC, HNF1HD, HNF1HE, HNF1HF, HNF1HG, HNF1HH, HNF1HI, HNF1HJ, HNF1HK, HNF1HL, HNF1HM, HNF1HN, HNF1HO, HNF1HP, HNF1HQ, HNF1HR, HNF1HS, HNF1HT, HNF1HU, HNF1HV, HNF1HW, HNF1HX, HNF1HY, HNF1HZ, HNF1IA, HNF1IB, HNF1IC, HNF1ID, HNF1IE, HNF1IF, HNF1IG, HNF1IH, HNF1II, HNF1IJ, HNF1IK, HNF1IL, HNF1IM, HNF1IN, HNF1IO, HNF1IP, HNF1IQ, HNF1IR, HNF1IS, HNF1IT, HNF1IU, HNF1IV, HNF1IW, HNF1IX, HNF1IY, HNF1IZ, HNF1JA, HNF1JB, HNF1JC, HNF1JD, HNF1JE, HNF1JF, HNF1JG, HNF1JH, HNF1JI, HNF1JJ, HNF1JK, HNF1JL, HNF1JM, HNF1JN, HNF1JO, HNF1JP, HNF1JQ, HNF1JR, HNF1JS, HNF1JT, HNF1JU, HNF1JV, HNF1JW, HNF1JX, HNF1JY, HNF1JZ, HNF1KA, HNF1KB, HNF1KC, HNF1KD, HNF1KE, HNF1KF, HNF1KG, HNF1KH, HNF1KI, HNF1KJ, HNF1KK, HNF1KL, HNF1KM, HNF1KN, HNF1KO, HNF1KP, HNF1KQ, HNF1KR, HNF1KS, HNF1KT, HNF1KU, HNF1KV, HNF1KW, HNF1KX, HNF1KY, HNF1KZ, HNF1LA, HNF1LB, HNF1LC, HNF1LD, HNF1LE, HNF1LF, HNF1LG, HNF1LH, HNF1LI, HNF1LJ, HNF1LK, HNF1LL, HNF1LM, HNF1LN, HNF1LO, HNF1LP, HNF1LQ, HNF1LR, HNF1LS, HNF1LT, HNF1LU, HNF1LV, HNF1LW, HNF1LX, HNF1LY, HNF1LZ, HNF1MA, HNF1MB, HNF1MC, HNF1MD, HNF1ME, HNF1MF, HNF1MG, HNF1MH, HNF1MI, HNF1MJ, HNF1MK, HNF1ML, HNF1MM, HNF1MN, HNF1MO, HNF1MP, HNF1MQ, HNF1MR, HNF1MS, HNF1MT, HNF1MU, HNF1MV, HNF1MW, HNF1MX, HNF1MY, HNF1MZ, HNF1NA, HNF1NB, HNF1NC, HNF1ND, HNF1NE, HNF1NF, HNF1NG, HNF1NH, HNF1NI, HNF1NJ, HNF1NK, HNF1NL, HNF1NM, HNF1NN, HNF1NO, HNF1NP, HNF1NQ, HNF1NR, HNF1NS, HNF1NT, HNF1NU, HNF1NV, HNF1NW, HNF1NX, HNF1NY, HNF1NZ, HNF1OA, HNF1OB, HNF1OC, HNF1OD, HNF1OE, HNF1OF, HNF1OG, HNF1OH, HNF1OI, HNF1OJ, HNF1OK, HNF1OL, HNF1OM, HNF1ON, HNF1OO, HNF1OP, HNF1OQ, HNF1OR, HNF1OS, HNF1OT, HNF1OU, HNF1OV, HNF1OW, HNF1OX, HNF1OY, HNF1OZ, HNF1PA, HNF1PB, HNF1PC, HNF1PD, HNF1PE, HNF1PF, HNF1PG, HNF1PH, HNF1PI, HNF1PJ, HNF1PK, HNF1PL, HNF1PM, HNF1PN, HNF1PO, HNF1PP, HNF1PQ, HNF1PR, HNF1PS, HNF1PT, HNF1PU, HNF1PV, HNF1PW, HNF1PX, HNF1PY, HNF1PZ, HNF1QA, HNF1QB, HNF1QC, HNF1QD, HNF1QE, HNF1QF, HNF1QG, HNF1QH, HNF1QI, HNF1QJ, HNF1QK, HNF1QL, HNF1QM, HNF1QN, HNF1QO, HNF1QP, HNF1QQ, HNF1QR, HNF1QS, HNF1QT, HNF1QU, HNF1QV, HNF1QW, HNF1QX, HNF1QY, HNF1QZ, HNF1RA, HNF1RB, HNF1RC, HNF1RD, HNF1RE, HNF1RF, HNF1RG, HNF1RH, HNF1RI, HNF1RJ, HNF1RK, HNF1RL, HNF1RM, HNF1RN, HNF1RO, HNF1RP, HNF1RQ, HNF1RR, HNF1RS, HNF1RT, HNF1RU, HNF1RV, HNF1RW, HNF1RX, HNF1RY, HNF1RZ, HNF1SA, HNF1SB, HNF1SC, HNF1SD, HNF1SE, HNF1SF, HNF1SG, HNF1SH, HNF1SI, HNF1SJ, HNF1SK, HNF1SL, HNF1SM, HNF1SN, HNF1SO, HNF1SP, HNF1SQ, HNF1SR, HNF1SS, HNF1ST, HNF1SU, HNF1SV, HNF1SW, HNF1SX, HNF1SY, HNF1SZ, HNF1TA, HNF1TB, HNF1TC, HNF1TD, HNF1TE, HNF1TF, HNF1TG, HNF1TH, HNF1TI, HNF1TJ, HNF1TK, HNF1TL, HNF1TM, HNF1TN, HNF1TO, HNF1TP, HNF1TQ, HNF1TR, HNF1TS, HNF1TT, HNF1TU, HNF1TV, HNF1TW, HNF1TX, HNF1TY, HNF1TZ, HNF1UA, HNF1UB, HNF1UC, HNF1UD, HNF1UE, HNF1UF, HNF1UG, HNF1UH, HNF1UI, HNF1UJ, HNF1UK, HNF1UL, HNF1UM, HNF1UN, HNF1UO, HNF1UP, HNF1UQ, HNF1UR, HNF1US, HNF1UT, HNF1UU, HNF1UV, HNF1UW, HNF1UX, HNF1UY, HNF1UZ, HNF1VA, HNF1VB, HNF1VC, HNF1VD, HNF1VE, HNF1VF, HNF1VG, HNF1VH, HNF1VI, HNF1VJ, HNF1VK, HNF1VL, HNF1VM, HNF1VN, HNF1VO, HNF1VP, HNF1VQ, HNF1VR, HNF1VS, HNF1VT, HNF1VU, HNF1VV, HNF1VW, HNF1VX, HNF1VY, HNF1VZ, HNF1WA, HNF1WB, HNF1WC, HNF1WD, HNF1WE, HNF1WF, HNF1WG, HNF1WH, HNF1WI, HNF1WJ, HNF1WK, HNF1WL, HNF1WM, HNF1WN, HNF1WO, HNF1WP, HNF1WQ, HNF1WR, HNF1WS, HNF1WT, HNF1WU, HNF1WV, HNF1WW, HNF1WX, HNF1WY, HNF1WZ, HNF1XA, HNF1XB, HNF1XC, HNF1XD, HNF1XE, HNF1XF, HNF1XG, HNF1XH, HNF1XI, HNF1XJ, HNF1XK, HNF1XL, HNF1XM, HNF1XN, HNF1XO, HNF1XP, HNF1XQ, HNF1XR, HNF1XS, HNF1XT, HNF1XU, HNF1XV, HNF1XW, HNF1XX, HNF1XY, HNF1XZ, HNF1YA, HNF1YB, HNF1YC, HNF1YD, HNF1YE, HNF1YF, HNF1YG, HNF1YH, HNF1YI, HNF1YJ, HNF1YK, HNF1YL, HNF1YM, HNF1YN, HNF1YO, HNF1YP, HNF1YQ, HNF1YR, HNF1YS, HNF1YT, HNF1YU, HNF1YV, HNF1YW, HNF1YX, HNF1YY, HNF1YZ, HNF1ZA, HNF1ZB, HNF1ZC, HNF1ZD, HNF1ZE, HNF1ZF, HNF1ZG, HNF1ZH, HNF1ZI, HNF1ZJ, HNF1ZK, HNF1ZL, HNF1ZM, HNF1ZN, HNF1ZO, HNF1ZP, HNF1ZQ, HNF1ZR, HNF1ZS, HNF1ZT, HNF1ZU, HNF1ZV, HNF1ZW, HNF1ZX, HNF1ZY, HNF1ZZ.

[0066] Paciente: como se usa en el presente documento, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier organismo al que se le puede administrar una composición, por ejemplo, para fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos, cosméticos y / o terapéuticos. Los pacientes típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y / o seres humanos). En algunas realizaciones, un paciente es un humano. En algunas realizaciones, un paciente sufre o es susceptible a uno o más trastornos o afecciones. En algunas realizaciones, un paciente muestra uno o más síntomas de un trastorno o afección. En algunas realizaciones, a un paciente se le ha diagnosticado uno o más trastornos o afecciones. En algunas realizaciones, el trastorno o afección es o incluye cáncer, o presencia de uno o más tumores. En algunas realizaciones, dicho cáncer o tumor es o comprende un cáncer de la próstata, o tumor en la próstata. En algunas realizaciones, el trastorno o afección es cáncer metastásico. En algunas realizaciones, el trastorno o afección es melanoma.

[0067] Péptido: el término "péptido" se refiere a dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. En algunas realizaciones, "péptido" se refiere a un polipéptido que tiene una longitud de menos de aproximadamente 100 aminoácidos, menos de aproximadamente 50 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos o menos de 10 aminoácidos.

[0068] Ácido nucleico peptídico: el término "ácido nucleico peptídico" se refiere a polímeros sintéticos similares a ADN o ARN, pero que carecen de esqueletos de azúcar desoxirribosa y ribosa, respectivamente. Los ácidos nucleicos peptídicos poseen un esqueleto compuesto por unidades de N- (2-aminoetil) -glicina repetidas unidas por enlaces peptídicos. Las bases de purina y pirimidina están unidas al esqueleto por un puente de metileno y un grupo carbonilo.

[0069] Farmacéuticamente aceptable: el término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias que, dentro del alcance de un buen juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación razonable entre beneficio y riesgo.

[0070] Composición farmacéutica: como se usa en este documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a un agente activo, formulado junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el agente activo está presente en una dosis unitaria apropiada para la administración en un régimen terapéutico que muestra una probabilidad estadísticamente significativa de lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a una población relevante. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse especialmente para su administración en forma sólida o líquida, incluidas las adaptadas para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, empapados (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), tabletas, por ejemplo, aquellas destinadas a absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación

a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento o un parche o aerosol de liberación controlada que se aplica en la piel, los pulmones o la cavidad oral; por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como pesario, crema o espuma; sublingualmente, ocularmente, transdérmicamente o nasalmente, pulmonar, y a otras superficies mucosas.

[0071] Polipéptido: como se usa en este documento, un "polipéptido", en términos generales, es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a otros por medio de al menos un enlace peptídico. Los expertos en la materia apreciarán que los polipéptidos a veces incluyen aminoácidos "no naturales" u otras entidades que, sin embargo, son capaces de integrarse en una cadena polipeptídica, opcionalmente.

[0072] Información pronóstica y predictiva: como se usa en este documento, los términos información pronóstica y predictiva se usan indistintamente para referirse a cualquier información que pueda usarse para indicar cualquier aspecto del curso de una enfermedad o afección, ya sea en ausencia o en presencia de tratamiento. Dicha información puede incluir, pero no se limita a, la esperanza de vida promedio de un paciente, la probabilidad de que un paciente sobreviva por un período de tiempo determinado (por ejemplo, 6 meses, 1 año, 5 años, etc.), la probabilidad que un paciente se curará de una enfermedad, la probabilidad de que la enfermedad de un paciente responda a una terapia particular (en donde la respuesta se puede definir de varias maneras). La información pronóstica y predictiva se incluye dentro de la amplia categoría de información de diagnóstico.

[0073] Promotor: como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a regiones de ADN que sirven como sitios de iniciación para la transcripción de un gen particular. Las secuencias de los promotores a menudo están abiertas / desenredadas y esperan ser vinculadas a otros elementos.

[0074] Proteína: como se usa en este documento, el término "proteína" se refiere a un polipéptido (es decir, una cadena de al menos 3-5 aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos). Las proteínas pueden incluir restos distintos de los aminoácidos (por ejemplo, pueden ser glicoproteínas, proteoglicanos, etc.) y / o pueden procesarse o modificarse de otro modo. En algunas realizaciones, la "proteína" puede ser un polipéptido completo producido y / o activo en una célula (con o sin una secuencia señal); en algunas realizaciones, una "proteína" es o comprende una porción característica tal como un polipéptido producido y / o activo en una célula. En algunas realizaciones, una proteína incluye más de una cadena polipeptídica. Por ejemplo, las cadenas polipeptídicas pueden estar unidas por uno o más enlaces disulfuro o asociadas por otros medios. En algunas realizaciones, las proteínas o polipéptidos como se describen en el presente documento pueden contener L-aminoácidos, D-aminoácidos, o ambos, y / o pueden contener cualquiera de una variedad de modificaciones de aminoácidos o análogos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, metilación, etc. En algunas realizaciones, las proteínas o polipéptidos pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos y / o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las proteínas son o comprenden anticuerpos, polipéptidos de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, porciones biológicamente activas de los mismos y / o porciones características de los mismos.

[0075] Respuesta: Como se usa en este documento, una respuesta al tratamiento puede referirse a cualquier alteración beneficiosa en la condición de un sujeto que ocurra como resultado o se relacione con el tratamiento. Dicha alteración puede incluir la estabilización de la afección (p. Ej., La prevención del deterioro que se habría producido en ausencia del tratamiento), la mejoría de los síntomas de la afección y / o la mejora de las perspectivas de curación de la afección, etc. puede referirse a la respuesta de un sujeto o a la respuesta de un tumor. La respuesta del tumor o del sujeto se puede medir de acuerdo con una amplia variedad de criterios, incluidos los criterios clínicos y los criterios objetivos. Las técnicas para evaluar la respuesta incluyen, entre otras, examen clínico, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada de rayos X, IRM, ecografía, endoscopia, laparoscopia, presencia o nivel de marcadores tumorales en una muestra obtenida de un sujeto, citología, y / o histología. Muchas de estas técnicas intentan determinar el tamaño de un tumor o de otro modo determinar la carga total del tumor. Los métodos y pautas para evaluar la respuesta al tratamiento se discuten en: Therasse et. al., "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors", European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada, J. Natl. Cancer Inst., 2000, 92(3):205-216. Los criterios de respuesta exactos se pueden seleccionar de cualquier manera apropiada, siempre que al comparar grupos de tumores y / o pacientes, los grupos que se comparan se evalúen según los mismos criterios o criterios comparables para determinar la tasa de respuesta. Un experto en la técnica podrá seleccionar los criterios apropiados.

[0076] Muestra: como se usa en este documento, una muestra obtenida de un sujeto puede incluir, entre otros, cualquiera o todos los siguientes: una célula o células, una porción de tejido, sangre, suero, ascitis, orina, saliva y otros fluidos corporales, secreciones, o excreciones. El término "muestra" también incluye cualquier material derivado

del procesamiento de dicha muestra. Las muestras derivadas pueden incluir moléculas de nucleótidos o polipéptidos extraídos de la muestra u obtenidos al someter la muestra a técnicas como la amplificación o la transcripción inversa de ARNm, etc.

5 **[0077]** Unión específica: como se usa en este documento, los términos "unión específica" o "específica para" o "específica para" se refieren a una interacción (típicamente no covalente) entre una entidad objetivo (por ejemplo, una proteína o polipéptido objetivo) y un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo proporcionado). Como entenderán los expertos en la materia, una interacción se considera "específica" si se favorece en presencia de interacciones alternativas. En algunas realizaciones, una interacción depende típicamente de la presencia de una característica estructural particular de la molécula diana tal como un determinante antigénico o epítipo reconocido por la molécula de unión. Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo A, la presencia de un polipéptido que contiene el epítipo A o la presencia de A libre sin marcar en una reacción que contiene tanto A libre como el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado que se une a el anticuerpo. Debe entenderse que la especificidad no necesita ser absoluta. Por ejemplo, es bien sabido en la técnica que numerosos anticuerpos reaccionan de forma cruzada con otros epítipos además de los presentes en la molécula diana. Dicha reactividad cruzada puede ser aceptable dependiendo de la aplicación para la cual se utilizará el anticuerpo. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar anticuerpos que tengan un grado de especificidad suficiente para llevar a cabo adecuadamente en cualquier aplicación dada (por ejemplo, para la detección de una molécula diana, con fines terapéuticos, etc.). La especificidad se puede evaluar en el contexto de factores adicionales, como la afinidad de la molécula de unión por la molécula diana frente a la afinidad de la molécula de unión por otras dianas (por ejemplo, competidores). Si una molécula de unión muestra una alta afinidad por una molécula diana que se desea detectar y una baja afinidad por moléculas no diana, el anticuerpo probablemente será un reactivo aceptable para propósitos de inmunodiagnóstico. Una vez que se establece la especificidad de una molécula de unión en uno o más contextos, se puede emplear en otros contextos, preferiblemente similares, sin reevaluar necesariamente su especificidad.

25 **[0078]** Estadio de cáncer: como se usa en este documento, el término "estadio de cáncer" se refiere a una evaluación cualitativa o cuantitativa del nivel de avance de un cáncer. Los criterios utilizados para determinar el estadio de un cáncer incluyen, entre otros, el tamaño del tumor y la extensión de las metástasis (por ejemplo, localizadas o distantes).

30 **[0079]** Sustancialmente: como se usa en este documento, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir la extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Una persona con experiencia ordinaria en las artes biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, se completan y / o se completan, logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en este documento para capturar la posible falta de integridad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

40 **[0080]** Que sufre de: A una persona que "padece" una enfermedad, trastorno o afección (cáncer) se le ha diagnosticado y / o presenta uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, un individuo que padece cáncer es un individuo que tiene un aumento de marcadores relacionados con tumores o intratumorales relacionados con el cáncer en relación con un individuo que no tiene cáncer.

45 **[0081]** Los síntomas se reducen: según la presente invención, "los síntomas se reducen" cuando uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección en particular se reducen en magnitud (por ejemplo, intensidad, gravedad, etc.) y / o frecuencia. Para mayor claridad, un retraso en la aparición de un síntoma particular se considera una forma de reducir la frecuencia de ese síntoma. Muchos pacientes de cáncer con tumores más pequeños no tienen síntomas. No se pretende que la presente invención se limite solo a los casos en que se eliminan los síntomas. La presente invención contempla específicamente el tratamiento de tal manera que uno o más síntomas se reducen (y la condición del sujeto se "mejora"), aunque no se elimina completamente.

50 **[0082]** Agente terapéutico: como se usa en el presente documento, la frase "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que tiene un efecto terapéutico y / o provoca un efecto biológico y / o farmacológico deseado, cuando se administra a un sujeto.

55 **[0083]** Cantidad terapéuticamente efectiva: como se usa en este documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado, en una relación razonable de riesgo / beneficio aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible mediante alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). En particular, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína o composición terapéutica eficaz para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como mejorando los síntomas asociados con la enfermedad, previniendo

60

o retrasando el inicio de la enfermedad, y / o también disminuyendo la severidad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y / o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad terapéuticamente efectiva específica (y / o la dosis unitaria) para cualquier paciente en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y / o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y como factores bien conocidos en las artes médicas.

[0084] Tratamiento: como se usa en este documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "tratando") se refiere a cualquier administración de una sustancia que alivia, mejora, revive, inhibe, retrasa, retrasa la aparición de, reduce o reduce la severidad parcial o total de o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y / o causas de una enfermedad, trastorno o afección en particular (por ejemplo, cáncer). Dicho tratamiento puede ser de un sujeto que no muestre signos de la enfermedad, trastorno y / o afecciones relevantes y / o de un sujeto que muestre solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno o afección. Alternativa o adicionalmente, tal tratamiento puede ser de un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y / o afecciones relevantes. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto al que se le haya diagnosticado una enfermedad, trastorno o afección relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto conocido por tener uno o más factores de susceptibilidad que se correlacionan estadísticamente con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno y / o afecciones relevantes.

[0085] Los términos PNA y resto de PNA se usan de manera intercambiable en este documento. Los términos agente de PNA y derivado de PNA se usan de manera intercambiable en este documento.

Descripción detallada de ciertas realizaciones

[0086] La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que es posible producir agentes de ácido nucleico peptídico (PNA) que atraviesan eficazmente las membranas celulares y específicamente dirigen y suprimen genes. Las modificaciones a los agentes de PNA mejoran la permeabilidad de la transmembrana, la estabilidad de unión a la diana, la solubilidad y la especificidad para los genes diana con secuencias específicas.

[0087] Agentes de PNA que comprenden: un resto de PNA; y un primer resto catiónico e hidrófobo en un primer extremo del resto de PNA; y se proporciona un segundo resto catiónico e hidrófobo en un segundo extremo del resto de PNA. En algunas realizaciones, se proporcionan agentes de PNA en los que el primer y el segundo resto catiónico e hidrófobo es o comprende un péptido. El primer y segundo péptido catiónico e hidrófobo comprende o consiste en residuos de lisina. Al menos un residuo de lisina comprende un resto de cadena lateral de palmitoil. En algunas realizaciones, el primer y / o segundo péptido catiónico y / o hidrófobo comprenden aminas. En algunas realizaciones, los agentes de PNA tienen una secuencia que no forma bucles de ovillo. En algunas realizaciones, los agentes de PNA deben tener una secuencia que no forme bucles en forma de ovillo. En algunas realizaciones, los agentes de PNA deben tener una secuencia que contenga menos del 60% de purinas.

[0088] En algunas realizaciones, el primer y / o segundo resto catiónico y / o hidrófobo es un resto dirigido y de entrega que ayuda al suministro de PNA a través de la membrana celular, mientras que el resto catiónico guía la estabilidad del PNA contra el esqueleto de fosfato diana. El segundo resto catiónico e hidrófobo es o comprende un segundo péptido catiónico que funciona en la misma capacidad que el primer resto catiónico / hidrófobo. El resto catiónico e hidrófobo está en el extremo N del agente de PNA. El objetivo, o el resto hidrófobo y catiónico está en el extremo C del agente de PNA. El primer resto catiónico e hidrófobo es un resto dirigido que ayuda al suministro de PNA a través de la membrana celular y se une al extremo N del agente de PNA; y el segundo resto catiónico e hidrófobo es o comprende un péptido catiónico que está unido en el extremo C del agente de PNA y guía la estabilidad del PNA contra el esqueleto de fosfato diana. En algunas realizaciones, se proporciona un segundo péptido catiónico N-terminal al péptido de PNA y C-terminal al resto dirigido.

[0089] En algunas realizaciones, se proporcionan agentes de PNA que tienen una secuencia que se dirige a un gen. En algunas realizaciones, los agentes de PNA tienen una secuencia que se dirige a una secuencia de 13-20 nucleótidos de un gen con una complementariedad del 75% o mayor. En algunas realizaciones, los agentes de PNA tienen una secuencia que se dirige a un ácido nucleico cuya longitud es de al menos 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos y / o la complementariedad es de al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

[0090] En algunas realizaciones, el componente de PNA incorpora una secuencia de sentido (ARNm) de un gen diana.

5 **[0091]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA tienen una secuencia que se dirige a una región no promotora de un gen. En algunas realizaciones, el gen es un oncogén. En algunas realizaciones, los oncogenes incluyen un elemento de secuencia mutante y los agentes de PNA tienen una secuencia que se dirige a un sitio que comprende o consiste en el elemento de secuencia mutante.

10 **[0092]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que comprende o consiste en una región de un oncogén BRAF que comprende una mutación correspondiente a una mutación V600E en una proteína BRAF. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que comprende o consiste en una región de un gen Gnaq que comprende una mutación correspondiente a una mutación Q209L en una proteína Gnaq.

15 **[0093]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que comprende o consiste en una región que comprende una unión de translocación de un oncogén. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que comprende o consiste en una región de una translocación MYB-NFIB que comprende una unión de genes MYB y NFIB o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que comprende o consiste en una región de una translocación FUS-CHOP que comprende una unión de genes FUS y CHOP o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que
20 comprende o que consiste en una región de una translocación EWS-FLI1 que comprende una unión de genes EWS y FLI1 o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que comprende o consiste en una región de una translocación BCR-ABL que comprende una unión de genes BCR y ABL o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que comprende o consiste en una región de una translocación SYT-SSX que comprende una unión de genes SYT y SSX o fragmentos de los mismos.
25 En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio de translocación que comprende una yuxtaposición / unión de dos regiones génicas o una región génica que contiene una mutación puntual o múltiples mutaciones puntuales.

30 **[0094]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a un sitio que comprende o consiste en una región que comprende una amplificación de un gen. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a amplificaciones de genes que comprenden AKT2, CDK4, MDM2, MYCN, CCNE, CCND1, KRAS, HRAS, EGFR, ERBB2, ERBB1, FGF, FGFR1, FGFR2, MYC, MYB y MET.

35 **[0095]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA tienen una secuencia que se dirige a un sitio en un gen, cuyos agentes de PNA se caracterizan porque cuando un sistema que comprende una célula que expresa el gen se expone al agente de PNA, la expresión del gen se reduce por una cantidad dentro del rango de 50% a 100% cuando el agente de PNA está presente en comparación con las condiciones comparables de otro modo cuando está ausente. En algunas realizaciones, el rango ideal depende de la respuesta medida por la disminución de la proliferación celular. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un animal. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un primate. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un ser humano. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un ratón BRAF. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende la célula en cultivo.

45 **[0096]** En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen una longitud dentro del intervalo de 13-18 nucleótidos. En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen palmitoil lisina unida a los extremos. En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen palmitoil lisina unida a ambos extremos N y C. En algunas realizaciones, los restos de PNA tienen una longitud de péptido de administración dentro del intervalo de 8-12 aminoácidos. En algunas realizaciones, los conjugados de PNA-péptido se estabilizan intramolecularmente por bases de nucleósidos que interactúan en π . En algunas realizaciones, el radio de giro del agente de PNA se reduce dentro del intervalo de 25% a 50% por exclusión de disolventes hidrófobos que impulsan las palmitoil lisinas N y C terminales proximales entre sí. En algunas realizaciones, los agentes de PNA, cuando se ponen en contacto con una membrana celular, cruzan la membrana 10 veces más rápidamente en comparación con los agentes de PNA de referencia que carecen de uno o ambos restos hidrófobos / catiónicos terminales. En algunas realizaciones, los agentes de PNA atraviesan las membranas una magnitud más fácilmente en función de los resultados de los experimentos de proliferación celular en comparación con y sin palmitoil lisinas terminales.
55

[0097] En algunas realizaciones, un resto de PNA tiene un primer resto catiónico y un primer resto hidrófobo en un primer extremo, y un segundo resto catiónico y un segundo resto hidrófobo en un segundo extremo, y el primer resto catiónico y el primer resto hidrófobo en el primer extremo los extremos son parte de un aminoácido, y el segundo resto catiónico y el segundo resto hidrófobo en el segundo extremo son parte de un aminoácido.
60

- 5 **[0098]** En el presente documento se describen además métodos para tratar o reducir el riesgo de una enfermedad, trastorno o afección, que comprenden: administrar a un sujeto susceptible a la enfermedad, trastorno o afección. Se proporcionan agentes de PNA. En algunas realizaciones, se proporcionan sujetos que padecen o son susceptibles al cáncer. En algunas realizaciones, los cánceres se seleccionan de melanoma, melanoma ocular y / o sarcoma.
- 10 **[0099]** Además, en el presente documento se describen métodos para reducir la expresión de un gen diana en una célula que comprende: poner en contacto una célula en la que la diana se expresa con al menos un agente de PNA; determinar un nivel o actividad del objetivo en la célula cuando el agente de PNA está presente en comparación con un nivel de referencia objetivo o actividad observada en condiciones de otro modo comparables cuando está ausente; y clasificar el al menos un agente de PNA como un inhibidor objetivo si el nivel o la actividad del objetivo se reduce significativamente cuando el agente de PNA está presente en comparación con el nivel o actividad de referencia objetivo.
- 15 **[0100]** En el presente documento se describen adicionalmente métodos para identificar y / o caracterizar agentes de PNA para inhibición de diana que comprenden: poner en contacto un sistema en el que se expresa una diana con al menos un agente de PNA; determinar un nivel o actividad del objetivo en el sistema cuando el agente de PNA está presente en comparación con un nivel de referencia objetivo o actividad observada en condiciones comparables cuando está ausente; y clasificar el al menos un agente de PNA como un inhibidor objetivo si el nivel o la actividad del objetivo se reduce significativamente cuando el agente de PNA está presente en comparación con el nivel o actividad de referencia objetivo. En algunas realizaciones, la supresión de un oncogén que conduce un tumor se mide determinando el nivel de actividad por la cantidad de supresión de la proliferación celular; la supresión del ARNm de oncogenes; y la supresión del producto proteico oncogénico. Los PNAs sin ningún extremo (d) lisina- (d) lisina palmitoil lisina, con un extremo (d) lisina- (d) lisina-palmitoil lisina, y con ambos extremos (d) lisina- (d) lisina-palmitoil lisina han sido evaluados. En algunas realizaciones, los PNA conjugados con NLS, TAT o cualquier otro péptido de administración, que incorporan tanto la lisina terminal (d) lisina- (d) lisina-palmitoil lisina muestran significativamente mejor que aquellos con un solo extremo derivatizado o sin extremos derivatizados.
- 25 **[0101]** En algunas realizaciones, uno o más de los siguientes agentes de PNA se pueden usar en relación con la presente invención: PNA con péptidos terminales que incluyen restos de amonio tetra-sustituido o sulfonio tri-sustituido.
- 30 **[0102]** En algunas realizaciones, el nivel o actividad del objetivo comprende un nivel de ARNm objetivo. En algunas realizaciones, el nivel o actividad de la diana comprende un nivel de proteína diana. En algunas realizaciones, el nivel o actividad del objetivo corresponde a la viabilidad celular. En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo corresponde a un aumento de más del 50% en la viabilidad celular. En algunas realizaciones, la supresión completa de la expresión génica no es necesaria para la supresión significativa de la proliferación celular / disminución de la viabilidad celular.
- 35 **[0103]** En algunas realizaciones, el sistema comprende un sistema *in vitro*. En algunas realizaciones, el sistema comprende un sistema *in vivo*. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende células.
- 40 **[0104]** En algunas realizaciones, las células comprenden células cancerosas. En algunas realizaciones, el sistema comprende células en cultivo celular. En algunas realizaciones, las células en cultivo celular comprenden células de tipo salvaje BRAF. En algunas realizaciones, las células de tipo salvaje BRAF comprenden células C918. En algunas realizaciones, las células en cultivo celular comprenden células de melanoma BRAF V600E. En algunas realizaciones, las células de melanoma BRAF V600E se seleccionan de células de melanoma uveal OCM1A y / o células de melanoma cutáneo SK-MEL 7.
- 45 **[0105]** En algunas realizaciones, el sistema es o comprende tejido. En algunas realizaciones, el sistema es o comprende un organismo. En algunas realizaciones, el nivel o actividad del objetivo corresponde a la supervivencia del organismo. En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo comprende un aumento de más del 50% en la supervivencia del organismo. En algunas realizaciones, el organismo comprende un ratón. En algunas realizaciones, el ratón comprende un ratón BRAF.
- 50 **[0106]** En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo comprende una reducción de más del 30-50% de la actividad objetivo. En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo comprende una reducción mayor que 50-100% de la actividad objetivo. En algunas realizaciones, una reducción significativa en el nivel o actividad del objetivo comprende una reducción de más del 50%
- 55

de los niveles objetivo. En algunas realizaciones, la reducción de la expresión de la diana del gen en un 30-50% reduce significativamente la proliferación de células tumorales en cultivos celulares.

5 **[0107]** En algunas realizaciones, el nivel de referencia es una referencia histórica. En algunas realizaciones, la referencia histórica se registra en un medio tangible y / o legible por computadora.

10 **[0108]** En algunas realizaciones, el objetivo es una región que comprende una mutación puntual en un oncogén. En algunas realizaciones, la diana es una región de un oncogén BRAF que comprende una mutación correspondiente a una mutación V600E en una proteína BRAF. En algunas realizaciones, el objetivo es una región de un gen Gnaq que comprende una mutación correspondiente a una mutación Q209L en una proteína Gnaq. En algunas realizaciones, el objetivo es una región que comprende una unión de translocación de un oncogén. En algunas realizaciones, el objetivo es una translocación MYB-NFIB que comprende una unión de genes MYB y NFIB o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, el objetivo es una translocación FUS-CHOP que comprende una unión de genes FUS y CHOP o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, el objetivo es una translocación BCR-ABL que comprende una unión de genes BCR y ABL o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, el objetivo es una translocación SYT-SSX que comprende una unión de genes SYT y SSX o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, el objetivo es una región que comprende una amplificación génica. En algunas realizaciones, la amplificación génica comprende una amplificación de AKT2, CDK4, MDM2, MYCN, CCNE, CCND1, KRAS, HRAS, EGFR, ERBB2, ERBB1, FGF, FGFR1, FGFR2, MYC, MYB y MET.

20 **[0109]** En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende agentes de PNA y vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración directa en un tejido diana. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración parenteral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración intradérmica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración transdérmica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración por inhalación. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es o comprende un líquido. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es o comprende un sólido.

30 **Estructura del agente del ácido nucleico peptídico (ANP)**

35 **[0110]** Los ácidos nucleicos peptídicos son polímeros sintéticos con similitudes con el ADN y el ARN. Los PNA poseen esqueletos de unidades de N- (2-aminoetil) -glicina repetidas que están unidas por enlaces peptídicos. Los PNA también se denominan restos de PNA en este documento. Esto difiere de las cadenas principales de ADN y ARN, que están compuestas de cadenas principales de azúcar desoxirribosa y ribosa, respectivamente. Además, las bases de pirimidina y purina están unidas al esqueleto de PNA por grupos carbonilo y puentes de metileno. Los esqueletos de PNA no contienen grupos fosfatos cargados. Por lo tanto, debido a la falta de repulsión electrostática, la unión entre las secuencias de PNA y las cadenas de ADN (o ARN) es más fuerte que la unión entre dos cadenas de ADN (o ARN). Debido a la mayor fuerza de unión, oligómeros de PNA más largos que 20-25 bases generalmente no son necesarios. Aumentar la longitud de las cadenas de PNA podría reducir la especificidad para las secuencias de ADN (o ARN) diana. Un desajuste de PNA / ADN tiene mayor inestabilidad que un desajuste de ADN / ADN; Los PNA exhiben mayor especificidad que el ADN cuando se unen a secuencias complementarias. La falta de grupos fosfato cargados también contribuye a la naturaleza hidrofóbica de los PNA, que no pueden cruzar las membranas celulares sin alguna modificación. Estas modificaciones pueden incluir, pero no se limitan a, unir covalentemente un péptido que penetra en la célula y / o agregar péptidos catiónicos / hidrófobos. Los PNA también son estables en un amplio rango de pH y son resistentes a la degradación de las enzimas, ya que no son reconocidas por proteasas o nucleasas.

50 **[0111]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA son complementarios a una secuencia diana. En algunas realizaciones, son copias exactas de una secuencia de ARNm expresada por un gen de interés. En algunas realizaciones, esta es también la secuencia de la cadena de sentido del gen. En algunas realizaciones, los agentes de PNA pueden crearse complementariamente a cualquier gen de interés.

55 **[0112]** Las realizaciones de la presente invención se basan en métodos para mejorar la capacidad de los agentes de PNA para cruzar membranas celulares. En algunas realizaciones, las propiedades fisicoquímicas de los agentes de PNA se han modificado para mejorar el suministro a través de las membranas celulares mediante la adición de péptidos de administración catiónicos / hidrófobos. En algunas realizaciones, los péptidos terminales hidrófobos y catiónicos juntos facilitan el transporte pasivo a través de las membranas. Los agentes de PNA que comprenden lisinas e-palmitoil hidrófobas en los extremos tienen capacidades mejoradas para cruzar membranas celulares en comparación con los conjugados de PNA-péptido estándar. En algunas realizaciones, los restos hidrófobos terminales en este diseño también permiten que los extremos sean impulsados hidrófobamente juntos, lo que disminuye el radio de giro del polímero. El tamaño más pequeño permite un mejor transporte. En algunas realizaciones, tener ambos

extremos del polímero de PNA derivatizado imparte más a fondo la funcionalización de la administración de esta molécula grande. Los terminales hidrófobos de lisina-palmitoil se activan juntos por exclusión de disolvente y el conjugado PNA-peptido se estabiliza de manera intramolecular adicionalmente mediante bases de nucleósidos que interactúan en pi. El conjugado PNA-peptido se vuelve más compacto debido a un radio de giro reducido, lo que permite que penetre más fácilmente en las bicapas lipídicas. En algunas realizaciones, el agente de PNA está compuesto por Lys (palmitoil) - (dLys) 2 en los extremos N y C, que contiene un péptido de administración de 10 aminoácidos de longitud y un PNA ~15-18mero. En algunas realizaciones, la estructura típica de los agentes de PNA incluye: un péptido de administración de aproximadamente 10 aminoácidos de longitud y un PNA ~15-18mero localizado dentro de los límites de dos Lys (palmitoil) - (dLys) 2-- extremos unidos por d -lisina. Por ejemplo: p.ej. Lys (palmitoil) - (dLys) péptido de liberación 2-PNA- (dLys) 2 - Lys (palmitoil).

[0113] En algunas realizaciones, los agentes de PNA emplean un péptido de administración de NLS modificado. En algunas realizaciones, los agentes de PNA emplean un péptido de administración de TAT modificado.

[0114] En algunas realizaciones, los agentes de PNA utilizados contra un objetivo BRAF V600E incluyen:

AcNH-Lys (palmitoil) -dLys-dLys-CCTCAAGAGTAATAATAT-dLys-dPro-dLys-dLys-dArg-dLys-dVal-dLys-dLys-Lys (palmitoil) -CONH2 [I-292-3 LL (empleando un péptido de administración NLS)]

y

AcNH-Lys (palmitoil) -dLys-dLys-CCTCAAGAGTAATAATAT-dLys-dArg3-dGln-dArg2-dLys2-dArg-Gly-dTyr-dLys-dLys-Lys (palmitoil) -CONH2. [I-292-9 L2 (empleando un péptido de administración de TAT modificado)].

Diana génica

[0115] En algunas realizaciones, los términos cargados catiónicamente mejoran la capacidad del PNA para dirigirse a genes con secuencias de ácido nucleico específicas. La estabilización de los extremos derivados de lisina cargados catiónicamente contra el ADN aniónico ofrece una unión cinéticamente más rápida por la nucleación terminal según el modelo estadístico Zimm-Bragg. Esto permite que el PNA se dirija a las secuencias no promotoras de una manera mejorada, lo cual es especialmente inesperado dado que las secuencias promotoras generalmente están abiertas / desenredadas y esperan la unión mientras que las regiones no promotoras de los genes son menos accesibles. El PNA se estabiliza contra su objetivo de ADN simplemente por carecer de fuerzas repulsivas repelente de fosfato aniónico - fosfato (ventaja entálpica). Los extremos catiónicos del péptido-PNA mejoran el componente entrópico de la unión al estabilizar los extremos más libres de la configuración del péptido-PNA contra la diana.

[0116] En algunas realizaciones, el PNA del conjugado PNA-peptido es de diseño estándar; el rango de longitud es generalmente de 13-18 bases. Para longitudes menores a 13 bases, la unión se vuelve mucho menos termodinámicamente favorable debido a la disminución de la entalpía de unión. Para longitudes mayores que 18 bases no ofrecen más de una ventaja termodinámica ya que la ganancia en energía de enlace entálpico es compensada por la desventaja cinética de colocar correctamente una cadena tan larga (más sustratos intramoleculares podrían competir con el estado de enlace).

[0117] En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a genes específicos o secuencias genéticas. Los agentes de PNA pueden diseñarse para dirigirse a genes que poseen secuencias mutadas conocidas, así como a sitios de translocaciones genéticas. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se dirigen a los oncogenes. En algunas realizaciones, los agentes de PNA pueden dirigirse a oncogenes mutantes. En algunas realizaciones, los oncogenes de tipo salvaje y mutantes que pueden seleccionarse se seleccionan del grupo que comprende ABL1, ABL2, AKT1, AKT2, ALK, ATF1, BCL11A, BCL2, BCL3, BCL6, BCR, BCR, BRAF, CARD11, CBLB, CBLC, CCND1, CCND2, CCND3, CDX2, CTNNB1, DDB2, DDIT3, DDX6, DEK, EGFR, ELK4, ERTV4, ETV6, EVI1, EVI1, EWSR1, FV1, FGFR1OP, FGFR2, FGFR2, FGFR2, FGFR2, FVIF, FGFR2, FGFR2, FGFR2, FGFR2, FUSF, FGFR1OP, FGFR2, FUSTA, IDH2, IRF4, JUN, KIT, KRAS, LCK, LMO2, MAF, MAFB, MAML2, MDM2, MET, MITF, MLL, MPL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NCOA4, NFKB2, NRAS, NTRK1, NUP214, PAX8, PDGFB, PIK3CA, PIM1, PLAG1, PPARG, PTPN11, RAF1, REL, RET, ROS1, SMO, SS18, TCL1A, TET2, TFG, TLX1, TPR y USP6. En algunas realizaciones, los oncogenes dirigidos comprenden BRAF y Gnaq. En algunas realizaciones, los agentes de PNA pueden dirigirse a sitios de anomalías genéticas. En algunas realizaciones, los agentes de PNA pueden dirigirse a sitios de translocaciones. En algunas realizaciones, los sitios de translocación pueden comprender la unión de la translocación MYB-NFIB. En algunas realizaciones, los sitios de translocación pueden comprender la unión de la translocación FUS-CHOP. En algunas realizaciones, los sitios de translocación pueden comprender la unión de la translocación BCR-ABL. En algunas realizaciones, los sitios de translocación pueden comprender la unión de la translocación SYT-SSX. Cualquier secuencia génica puede ser diana; Los agentes de PNA-peptido presentados están destinados a dirigirse contra oncogenes que comprenden mutaciones puntuales (y / o combinaciones de las mismas), puntos de translocación de genes, amplificaciones de genes o genes de tipo salvaje expresados en exceso que

impulsan tumores.

Sistemas para probar agentes de PNA

5 [0118] Los agentes PNA pueden probarse en líneas de cáncer, así como en líneas celulares que expresan anomalías genéticas. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se prueban en líneas celulares de cáncer. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se prueban en líneas celulares de melanoma. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se prueban en líneas celulares de melanoma uveal y cutáneo y de sarcoma de Ewings. Los agentes de PNA se pueden probar en líneas celulares que expresan una anomalía genética asociada con una enfermedad distinta del cáncer. Los agentes de PNA se pueden probar en líneas celulares neuronales y / o musculares con expresión génica aberrante. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se prueban en modelos de roedores que comprenden secuencias de genes mutantes. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se pueden probar en cualquier línea celular. Una variedad de líneas celulares se emplea para probar péptidos de PNA por un experto en la técnica.

Aplicaciones de Agentes de PNA

15 [0119] La selección y el enlace de los agentes de PNA tendrían usos como herramientas de investigación, diagnósticos médicos y tratamientos farmacéuticos. En algunas realizaciones, los agentes de PNA pueden usarse para dirigirse y unirse a secuencias genéticas específicas. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se pueden usar para suprimir la expresión de secuencias genéticas. Los agentes de PNA dirigidos a genes específicos pueden servir como valiosas herramientas de investigación para comprender la función de esos genes. Suprimir la expresión de productos genéticos particulares ayudaría a dilucidar y descubrir el papel de esos productos en diferentes vías biológicas.

20 [0120] En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para dirigir y suprimir la expresión de genes BRAF. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para dirigir y suprimir la expresión de genes BRAF mutantes. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se utilizan para dirigir y suprimir la expresión de genes Gnaq mutantes. En algunas realizaciones, los agentes de PNA pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con secuencias genéticas. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar enfermedades asociadas con genes BRAF mutados. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar enfermedades asociadas con genes Gnaq mutados. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar el cáncer.

30 [0121] En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar el cáncer en animales. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar el cáncer en mamíferos. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar el cáncer en primates. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar el cáncer en seres humanos.

35 [0122] Los agentes de PNA pueden dirigirse y unirse a secuencias genéticas mutadas y suprimir la expresión de oncogenes mutantes, suprimiendo y / o tratando así el cáncer. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar el cáncer debido a genes BRAF mutados. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar el cáncer debido a genes Gnaq mutados. En algunas realizaciones, los agentes de PNA se usan para tratar el cáncer debido a las translocaciones. Los agentes de PNA pueden dirigirse y unirse a uniones de translocaciones genéticas y suprimir la expresión de secuencias genéticas mutadas, previniendo y / o tratando así el cáncer asociado con la translocación. Las uniones de la translocación MYB-NF1B y la translocación FUS-CHOP pueden ser dirigidas y suprimidas por los agentes de PNA de la presente divulgación. Las uniones de la translocación BCR-ABL y la translocación SYT-SSX pueden ser dirigidas y suprimidas por los agentes de PNA de la presente divulgación. Los agentes de PNA pueden dirigirse y unirse a uniones de amplificaciones de genes y suprimir la expresión de secuencias genéticas mutadas, previniendo y / o tratando así el cáncer asociado a la amplificación. Las amplificaciones genéticas que comprenden los genes AKT2, CDK4, MDM2, MYCN, CCNE, CCND1, KRAS, HRAS, EGFR, ERBB2, ERBB1, FGF1, FGFR1, FGFR2, MYC, MYB y MET pueden ser dianas y suprimidas por agentes de PNA de la presente divulgación.

50 [0123] Los agentes de PNA se pueden usar para tratar anomalías genéticas en enfermedades no asociadas con el cáncer. Las enfermedades o afecciones causadas por un producto génico mutado pueden tratarse dirigiendo un agente de PNA al gen mutado que expresa el producto génico dañino. Los trastornos hereditarios o innatos pueden tratarse mediante el uso de agentes de PNA dirigidos. Los agentes de la ANP pueden usarse para suprimir genes normales, como los que apoyan la obesidad, los síndromes metabólicos o las vasculopatías relacionadas. Los agentes de PNA se pueden usar para atacar genes de hongos, genes virales o genes bacterianos que causan infección.

Composiciones farmacéuticas

55 [0124] La presente invención también proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos, fragmentos o porciones características proporcionadas de los mismos. La presente invención proporciona al menos un conjugado de PNA y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender y / o administrarse opcionalmente en combinación con una o más sustancias terapéuticas o

biológicamente activas adicionales. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas son útiles en medicina o en la fabricación de medicamentos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas son útiles como agentes profilácticos (es decir, vacunas) en el tratamiento o prevención del cáncer y trastornos neurodegenerativos de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas son útiles en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en individuos que padecen cáncer; por ejemplo, como vehículos de administración capaces de dirigirse específicamente a agentes o compuestos citotóxicos que bloquean la señalización celular aberrante. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son útiles simultáneamente en aplicaciones de diagnóstico y aplicaciones terapéuticas. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para la administración a seres humanos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo en combinación con o conjugado con un agente terapéutico u otro terapéutico como se define en el presente documento.

[0125] Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse en una forma inyectable estéril (por ejemplo, una forma que es adecuada para inyección subcutánea o infusión intravenosa). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se proporcionan en una forma de dosificación líquida que es adecuada para inyección. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se proporcionan como polvos (por ejemplo, liofilizados y / o esterilizados), opcionalmente al vacío, que se reconstituyen con un diluyente acuoso (por ejemplo, agua, solución amortiguadora, solución salina, etc.) antes de la inyección. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se diluyen y / o se reconstituyen en agua, solución de cloruro de sodio, solución de acetato de sodio, solución de alcohol bencílico, solución salina tamponada con fosfato, etc. En algunas realizaciones, el polvo debe mezclarse suavemente con el diluyente acuoso (por ejemplo, no agitado).

[0126] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, conservante, diluyente inerte, agente dispersante, agente tensoactivo y / o emulsionante, agente tampón, etc.). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más conservantes. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas no comprenden conservantes.

[0127] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se proporcionan en una forma que puede refrigerarse y / o congelarse. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se proporcionan en una forma que no puede refrigerarse y / o congelarse. En algunas realizaciones, las soluciones reconstituidas y / o las formas de dosificación líquidas pueden almacenarse durante un cierto período de tiempo después de la reconstitución (por ejemplo, 2 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 5 días, 7 días, 10 días, 2 semanas, un mes, dos meses, o más). En algunas realizaciones, el almacenamiento de composiciones de anticuerpos durante más tiempo del tiempo especificado da como resultado la degradación del anticuerpo.

[0128] Las formas de dosificación líquidas y / o soluciones reconstituidas pueden comprender partículas y / o decoloración antes de la administración. En algunas realizaciones, no debe usarse una solución si está decolorada o turbia y / o si quedan partículas después de la filtración.

[0129] Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado a continuación en la técnica de farmacología. En algunas realizaciones, tales métodos de preparación incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con uno o más excipientes y / o uno o más ingredientes accesorios adicionales, y luego, si es necesario y / o deseable, conformar y / o empaquetar el producto en una Unidad de dosis única o múltiple deseada.

[0130] Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede preparar, envasar y / o vender a granel, como una dosis unitaria única, y / o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo; por ejemplo, un agente peptídico de ácido nucleico. La cantidad de ingrediente activo es generalmente igual a una dosis que se administraría a un sujeto y / o una fracción conveniente de una dosis tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

[0131] Las cantidades relativas de ingrediente activo, excipiente farmacéuticamente aceptable y / o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención pueden variar, dependiendo de la identidad, tamaño y / o condición del sujeto tratado y / o dependiendo de la ruta por el cual se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p / p) de ingrediente activo.

[0132] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en el presente documento, puede ser o comprender disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, espesantes o agentes emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, adecuados para la forma de dosificación particular deseada. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) describe diversos excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Excepto en la medida en que cualquier medio excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, como al producir cualquier efecto biológico indeseable o de otra manera interactuar de manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, se contempla su uso dentro del alcance de esta invención.

Conjugados en general

[0133] Los agentes multifuncionales descritos en este documento comprenden múltiples entidades, cada una de las cuales tiene al menos una función. Ciertas realizaciones de agentes multifuncionales contemplados comprenden una entidad de direccionamiento y al menos una de las siguientes entidades: una entidad de detección, una entidad terapéutica y una entidad de diagnóstico. En algunas realizaciones, un agente multifuncional de la invención contiene una entidad de direccionamiento, una entidad terapéutica y una entidad de detección. En algunas realizaciones, las entidades de un agente pueden conjugarse una a la otra. La conjugación de varias entidades para formar un agente multifuncional no se limita a modos particulares de conjugación. Por ejemplo, dos entidades pueden conjugarse covalentemente directamente entre sí. Alternativamente, dos entidades pueden conjugarse indirectamente entre sí, como a través de una entidad enlazadora. En algunas realizaciones, un agente multifuncional puede incluir diferentes tipos de conjugación dentro del agente, de modo que algunas entidades del agente se conjugan a través de la conjugación directa, mientras que otras entidades del agente se conjugan indirectamente a través de uno o más enlazadores. En algunas realizaciones, un agente multifuncional de la invención comprende el único tipo de entidad enlazadora. En algunas realizaciones, un agente multifuncional de la invención comprende más de un tipo de entidades enlazadoras. En algunas realizaciones, un agente multifuncional incluye un solo tipo de entidades enlazadoras, pero de longitud variable.

[0134] En algunas realizaciones, existe una asociación covalente entre o dentro de las entidades contenidas en un agente multifuncional. Como apreciará un experto en la técnica, los restos pueden unirse entre sí directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlazador, como se describe a continuación).

[0135] En algunas realizaciones, cuando una entidad (como una entidad de direccionamiento) y una segunda entidad de un agente multifuncional están directamente enlazadas de manera covalente entre sí, tal conjugación covalente directa puede ser a través de un enlace (por ejemplo, un enlazador o entidad de enlace) tal como un enlace amida, éster, carbono-carbono, disulfuro, carbamato, éter, tioéter, urea, tiourea, isotiourea, amina o carbonato. La conjugación covalente se puede lograr aprovechando los grupos funcionales presentes en la primera entidad y / o la segunda entidad del agente multifuncional. Alternativamente, un aminoácido no crítico puede ser reemplazado por otro aminoácido que introducirá un grupo útil (como amino, carboxi o sulfhidrilo) con fines de acoplamiento. Alternativamente, se puede agregar un aminoácido adicional a al menos una de las entidades del agente multifuncional para introducir un grupo útil (como amino, carboxi o sulfhidrilo) con fines de acoplamiento. Los grupos funcionales adecuados que pueden usarse para unir restos incluyen, entre otros, aminas, anhídridos, grupos hidroxilo, grupos carboxi, tioles y similares. Se puede usar un agente activador, como una carbodiimida, para formar un enlace directo. Una amplia variedad de agentes activadores son conocidos en la técnica y son adecuados para conjugar una entidad con una segunda entidad.

[0136] En algunas realizaciones, las entidades de un agente multifuncional abarcadas por la presente invención están unidas de forma covalente indirecta entre sí a través de un grupo enlazador. Este grupo de vinculador también puede denominarse vinculador o entidad de enlace. Esto se puede lograr utilizando cualquier número de agentes bifuncionales estables bien conocidos en la técnica, incluidos los agentes homofuncionales y heterofuncionales (para ejemplos de dichos agentes, ver, por ejemplo, Pierce Catalog and Handbook). El uso de un enlazador bifuncional difiere del uso de un agente activador en que el primero da lugar a que esté presente un resto de enlace en el conjugado resultante (agente), mientras que el último resulta en un acoplamiento directo entre los dos restos involucrados en la reacción. El papel de un enlazador bifuncional puede ser permitir la reacción entre dos restos inertes. Alternativa o adicionalmente, el enlazador bifuncional que se convierte en parte del producto de reacción puede seleccionarse de modo que confiera cierto grado de flexibilidad conformacional al agente (por ejemplo, el enlazador bifuncional comprende una cadena de alquilo recta que contiene varios átomos, por ejemplo, el alquilo de cadena recta). La cadena contiene entre 2 y 10 átomos de carbono). Alternativa o adicionalmente, el enlazador bifuncional puede seleccionarse de manera que el enlace formado entre un anticuerpo proporcionado y un agente terapéutico sea escindible, por ejemplo, hidrolizable (para ejemplos de tales enlazadores, véase, p. Ej., U.S. Pat. Nos. 5,773,001; 5,739,116 y 5,877,296, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Tales enlazadores, por ejemplo, pueden usarse cuando se observa una mayor actividad de ciertas

entidades, como un agente de direccionamiento y / o de una entidad terapéutica después de la hidrólisis del conjugado. Los mecanismos ejemplares mediante los cuales una entidad puede ser escindida de un agente multifuncional incluyen hidrólisis en el pH ácido de los lisosomas (hidrazonas, acetales y amidas similares al cis-aconitato), escisión de péptidos por enzimas lisosomales (las captepsinas y otras enzimas lisosómicas), y reducción de disulfuros). Otro mecanismo por el cual dicha entidad se escinde del agente multifuncional incluye la hidrólisis a pH fisiológico extra o intracelular. Este mecanismo se aplica cuando el reticulante utilizado para acoplar una entidad a otra entidad es un componente biodegradable / bioerosionable, como el polidextrano y similares.

[0137] Por ejemplo, los agentes multifuncionales que contienen hidrazona se pueden hacer con grupos carbonilos introducidos que proporcionan las propiedades de liberación deseadas. Los agentes multifuncionales también pueden prepararse con un enlazador que comprende una cadena de alquilo con un grupo disulfuro en un extremo y un derivado de hidrazina en el otro extremo. Los enlazadores que contienen grupos funcionales distintos de las hidrazonas también tienen el potencial de ser escindidos en el medio ácido de los lisosomas. Por ejemplo, los agentes multifuncionales pueden fabricarse a partir de enlazadores reactivos con tiol que contienen un grupo distinto de una hidrazona que se puede escindir intracelularmente, como ésteres, amidas y acetales / cetales.

[0138] Otro ejemplo de clase de enlazadores sensibles al pH son los cis-aconitatos, que tienen un grupo ácido carboxílico yuxtapuesto a un grupo amida. El ácido carboxílico acelera la hidrólisis de la amida en los lisosomas ácidos. También se pueden usar enlazadores que logran un tipo similar de aceleración de la velocidad de hidrólisis con varios otros tipos de estructuras.

[0139] Otro método de liberación potencial para los conjugados de los agentes terapéuticos es la hidrólisis enzimática de los péptidos por las enzimas lisosomales. En un ejemplo, un anticuerpo proporcionado se une a través de un enlace amida al alcohol para-aminobencílico y luego se forma un carbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y el agente terapéutico. La escisión del péptido conduce al colapso del carbamato o carbonato de amino bencilo y la liberación del agente terapéutico. En otro ejemplo, un fenol se puede dividir por colapso del enlazador en lugar del carbamato. En otra variación, la reducción de disulfuro se utiliza para iniciar el colapso de un carbamato o carbonato de paramercaptobencilo.

[0140] Los enlazadores útiles que pueden usarse como una entidad de enlace de un agente multifuncional proporcionado en el presente documento incluyen, sin limitación: polietilenglicol, un copolímero de etilenglicol, un polipropilenglicol, un copolímero de propilenglicol, una carboximetilcelulosa, una polivinilpirrolidona, una polivinilo 1,3-dioxolano, un poli-1,3,6-trioxano, un copolímero de etileno / anhídrido maleico, un poliaminoácido, un dextrano n-vinil pirrolidona, un poli n-vinil pirrolidona, un homopolímero de propilenglicol, un polímero de óxido de propileno, un polímero de óxido de etileno, un poliol polioxietilado, un alcohol polivinílico, una cadena glicosilada lineal o ramificada, un poliactal, un ácido graso de cadena larga, un grupo alifático hidrófobo de cadena larga.

[0141] Algunas realizaciones de la invención utilizan agentes multifuncionales que incluyen al menos una entidad asociada no covalentemente. Los ejemplos de interacciones no covalentes incluyen, pero no se limitan a, interacciones hidrófobas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo, interacciones de van der Waals y enlaces de hidrógeno. Independientemente de la naturaleza de la unión, interacción o acoplamiento, la asociación entre una primera entidad y una segunda entidad es, en algunas realizaciones, selectiva, específica y lo suficientemente fuerte como para que la segunda entidad contenida en el agente no se disocie de la primera Entidad antes o durante el transporte / entrega hacia y hacia el destino. Por lo tanto, la asociación entre múltiples entidades de un agente multifuncional se puede lograr utilizando cualquier acoplamiento químico, bioquímico, enzimático o genético conocido por un experto en la materia.

Conjugados terapéuticos

[0142] Como se describe en este documento, los agentes de PNA pueden comprender parte de agentes multifuncionales con utilidad terapéutica relacionada con el cáncer o trastornos neurodegenerativos. Los ejemplos de utilidades terapéuticas en el contexto de la presente divulgación incluyen, sin limitación, la utilidad asociada con la orientación (por ejemplo, secuencias génicas específicas de unión), la utilidad asociada con los efectos terapéuticos (por ejemplo, efectos citotóxicos y / o citostáticos, efectos anti-proliferativos, anti (efectos anti-angiogénicos, reducción de síntomas, etc.), y utilidad asociada al diagnóstico, detección o etiquetado, etc.

[0143] Una entidad de orientación es una estructura molecular que puede estar contenida en un agente que afecta o controla el sitio de acción al interactuar específicamente con una diana de interés, o que tiene afinidad con ella. Como ejemplo, una diana puede ser una molécula o un complejo molecular presente en una superficie celular, por ejemplo, ciertos tipos de células, tejidos, etc. En algunas realizaciones de la invención, la diana es un gen asociado a tumor o intratumoral y la entidad de direccionamiento es un agente de la ANP. El uso de restos de direccionamiento para

agentes, tales como agentes terapéuticos, es conocido en la técnica. En el contexto de la presente solicitud, las células cancerosas primarias o metastásicas, así como otros tipos de células, son la diana. Es decir, a nivel molecular, una diana es una molécula o un constituyente celular que está presente (por ejemplo, expresado de manera preferencial) en una célula, de manera que puede unirse de manera específica o preferente a los agentes de PNA al contacto. Los agentes de PNA de la invención ejercen especificidad por su diana (por ejemplo, oncogenes de células cancerosas) y pueden localizarse en los núcleos y unirse a su diana. En algunas realizaciones, las entidades dirigidas al agente de PNA se localizan en las células cancerosas y conservan su asociación durante un período de tiempo. En algunas realizaciones, las dianas del agente de PNA son las secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de membrana intratumorales y / o integrales.

[0144] En algunas realizaciones, los agentes de PNA son agentes multifuncionales que comprenden una entidad de direccionamiento de genes, que consiste esencialmente en un agente de PNA, conjugado con uno o más agentes terapéuticos. Realizaciones no limitantes de conjugados útiles de agentes de PNA que pueden usarse en el diagnóstico o evaluación de, tratamiento y fabricación de medicamentos para el cáncer u otros trastornos se proporcionan a continuación.

[0145] Los agentes anticancerígenos de ácido nucleico adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen aquellos agentes que se dirigen a los genes asociados con la tumorigénesis y el crecimiento celular o la transformación celular (por ejemplo, proto-oncogenes, que codifican proteínas que estimulan la división celular), genes angiogénicos / genes anti-angiogénicos, genes supresores de tumores (que codifican proteínas que suprimen la división celular), genes que codifican proteínas asociadas con el crecimiento y / o migración de tumores, y genes suicidas (que inducen apoptosis u otras formas de muerte celular), especialmente genes suicidas que son más activos en las células que se dividen rápidamente.

[0146] Ejemplos de genes asociados con tumorigénesis y / o transformación celular incluyen genes de fusión MLL, BCR-ABL, TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, Bc1-2, AML1-ETO, AML1-MTG8, Ras, Fos PDGF, RET, APC, NF-1, Rb, p53, MDM2 y similares; genes sobreexpresados tales como genes de resistencia a múltiples fármacos; ciclinas; beta-catenina; genes de telomerasa; c-myc, n-myc, Be1-2, Erb-B1 y Erb-B2; y genes mutados tales como Ras, Mos, Raf y Met. Los ejemplos de genes supresores de tumores incluyen, entre otros, p53, p21, RB1, WT1, NF1, VHL, APC, DAP quinasa, p16, ARF, Neurofibromin y PTEN. Los ejemplos de genes a los que pueden dirigirse los agentes de ácido nucleico útiles en la terapia anticancerosa incluyen genes que codifican proteínas asociadas con la migración de tumores, tales como integrinas, selectinas y metaloproteinasas; genes anti-angiogénicos que codifican proteínas que promueven la formación de nuevos vasos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o VEGFr; genes anti-angiogénicos que codifican proteínas que inhiben la neovascularización, como la endostatina, la angiostatina y el VEGF-R2; y genes que codifican proteínas tales como interleucinas, interferón, factor de crecimiento de fibroblastos (α -FGF y β -FGF), factor de crecimiento similar a la insulina (por ejemplo, IGF-1 e IGF-2), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento transformante (por ejemplo, TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de células madre y su receptor c-Kit (SCF / c-Kit) ligando, CD40L / CD40, VLA-4 VCAM-1, ICAM-1 / LFA-1, hialurina / CD44, y similares.

[0147] Los agentes de PNA pueden tener cualquiera de una variedad de usos que incluyen, por ejemplo, uso como agentes anticancerosos u otros agentes terapéuticos, sondas, cebadores, etc. Los agentes de ácido nucleico pueden tener actividad enzimática (por ejemplo, actividad de la ribozima), actividad inhibitoria de la expresión génica (por ejemplo, como agentes antisentido o siRNA, etc.), y / u otras actividades. Los agentes de ácidos nucleicos pueden ser activos por sí mismos o pueden ser vectores que liberan agentes de ácido nucleico activos (por ejemplo, a través de la replicación y / o transcripción de un ácido nucleico administrado). Para los fines de la presente memoria descriptiva, tales ácidos nucleicos de vectores se consideran "agentes terapéuticos" si codifican o suministran de otro modo un agente terapéuticamente activo, incluso si ellos mismos no tienen actividad terapéutica.

[0148] En algunas realizaciones, los conjugados de agentes de PNA comprenden un agente terapéutico de ácido nucleico que es una ribozima. Como se usa en el presente documento, el término "ribozima" se refiere a una molécula de ARN catalítica que puede escindir otras moléculas de ARN o ADN de una manera específica al objetivo. Las ribozimas se pueden usar para regular a la baja la expresión de cualquier producto indeseable de genes de interés. Los ejemplos de ribozimas que se pueden usar en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos específicos para ARNm o ADN de oncogenes.

[0149] En algunas realizaciones, las entidades o restos dentro de los conjugados de los agentes de PNA comprenden un fotosensibilizador utilizado en terapia fotodinámica (PDT). En la PDT, la administración local o sistémica de un fotosensibilizador a un paciente es seguida por una irradiación con luz que es absorbida por el fotosensibilizador en el tejido u órgano a tratar. La absorción de luz por el fotosensibilizador genera especies reactivas (por ejemplo, radicales)

que son perjudiciales para las células. Para una eficacia máxima, un fotosensibilizador está típicamente en una forma adecuada para la administración, y también en una forma que puede sufrir fácilmente una internalización celular en el sitio objetivo, a menudo con cierto grado de selectividad sobre los tejidos normales.

5 **[0150]** Los conjugados de agentes de PNA asociados con un fotosensibilizador pueden usarse como nuevos sistemas de administración en PDT. Además de reducir la agregación del fotosensibilizador, el suministro de fotosensibilizadores de acuerdo con la presente invención exhibe otras ventajas tales como una mayor especificidad para los tejidos / órganos diana y la internalización celular del fotosensibilizador.

10 **[0151]** Los fotosensibilizadores adecuados para uso en la presente invención incluyen cualquiera de una variedad de moléculas sintéticas y naturales que tienen propiedades fotosensibilizadoras útiles en PDT. En algunas realizaciones, el espectro de absorción del fotosensibilizador está en el rango visible, típicamente entre 350 nm y 1200 nm, preferiblemente entre 400 nm y 900 nm, por ejemplo, entre 600 nm y 900 nm. Los fotosensibilizadores adecuados que pueden acoplarse a toxinas de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, porfirinas y derivados de porfirina (por ejemplo, clorinas, bacterioclorinas, isobacterioclorinas, ftalocianinas y naftalocianinas); metaloporfirinas, metaloftalocianinas, angelicinas, colorantes chalcogenapyrrillium, clorofilas, cumarinas, flavinas y compuestos afines como aloxazina y riboflavina, fullerenos, feoforburos, pirofeoforburos, cianinas (por ejemplo, merocianina 540), feofitinas, zafirinas, texafirinas, purpurinas, porfínicos, fenotiazinios, derivados del azul de metileno, naftalamidas, derivados del azul de nilo, quinonas, perilenquinonas (por ejemplo, hipericinas, hipocrellinas y cercosporinas), psoralenos, quinonas, retinoides, rodaminas, tiofenos, verdines, colorantes xantenos (p. ej. eosinas, eritrosinas, rosas bengalas), formas diméricas y oligoméricas de porfirinas, y profármacos como el ácido 5-aminolevulínico (R.W. Redmond y J.N. Gamlin, *Photochem. Photobiol.*, 1999, 70: 391-475).

25 **[0152]** Los ejemplos de fotosensibilizadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen los descritos en las patentes U.S. nos. 5,171,741; 5,171,749; 5,173,504; 5,308,608; 5,405,957; 5,512,675; 5,726,304; 5,831,088; 5,929,105; y 5,880,145 (Los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad).

30 **[0153]** En algunas realizaciones, los conjugados de agentes de PNA comprenden un radiosensibilizador. Como se usa en el presente documento, el término "radiosensibilizador" se refiere a una molécula, compuesto o agente que hace que las células tumorales sean más sensibles a la radioterapia. La administración de un radiosensibilizador a un paciente que recibe radioterapia generalmente mejora los efectos de la radioterapia. La ventaja de acoplar un radiosensibilizador a una entidad de direccionamiento (por ejemplo, agentes de PNA capaces de apuntar a secuencias genéticas intratumorales) es que los efectos de radiosensibilización solo se dan en las células diana. Para facilitar su uso, un radiosensibilizador también debe poder encontrar las células diana, incluso si se administra de forma sistémica. Sin embargo, los radiosensibilizadores disponibles actualmente no suelen ser selectivos para los tumores, y se distribuyen por difusión en un cuerpo de mamífero. Los conjugados de agentes de PNA de la presente invención se pueden usar como un nuevo sistema de administración para radiosensibilizadores.

40 **[0154]** Se conocen en la técnica una variedad de radiosensibilizadores. Los ejemplos de radiosensibilizadores adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel (TAXOL®), carboplatino, cisplatino y oxaliplatino (Amorino et al., *Radiat. Oncol. Investig.*, 1999, 7: 343-352; Choy, *Oncology*, 1999, 13: 22-38; Safran et al., *Cancer Invest.*, 2001, 19: 1-7; Dionet et al., *Anticancer Res.*, 2002, 22: 721-725; Cividalli et al., *Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2002, 52: 1092-1098); gemcitabina (Gemzar®) (Choy, *Oncology*, 2000, 14: 7-14; Momex and Girard, *Annals of Oncology*, 2006, 17: 1743-1747); etanidazol (Nitrolmidazole®) (Inanami et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 2002, 78: 267-274); misonidazol (Tamulevicius et al., *Br. J. Radiology*, 1981, 54: 318-324.; Palcic et al., *Radiat. Res.*, 1984, 100: 340-347.), tirapazamina (Masunaga et al., *Br. J. Radiol.*, 2006, 79: 991-998; Rischin y otros, *J. Clin. Oncol.*, 2001, 19: 535-542; Shulman y otros, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1999, 44: 349-353.); y derivados de bases de ácido nucleico, por ejemplo, purinas halogenadas o pirimidinas, tales como 5-fluorodeoxiuridina (Buchholz et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1995, 32: 1053-1058).

55 **[0155]** En algunas realizaciones, los conjugados de agentes de PNA comprenden un radioisótopo. Los ejemplos de radioisótopos adecuados incluyen cualquier emisor α , β o γ , que, cuando se localiza en el sitio de un tumor, produce destrucción celular (S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (Eds.), Academic Press, 1985). Los ejemplos de tales radioisótopos incluyen, pero no se limitan a, yodo-131 (^{131}I), yodo-125 (^{125}I), bismuto-212 (^{212}Bi), bismuto-213 (^{213}Bi), astatine-211 (^{211}At), renio-186 (^{186}Re), renio-188 (^{188}Re), fósforo-32 (^{32}P), itrio-90 (^{90}Y), samario-153 (^{153}Sm), y lutecio-177 (^{177}Lu).

60 **[0156]** En algunas realizaciones, los conjugados de los agentes de PNA se pueden usar en la terapia dirigida con

profármacos enzimáticos. En un enfoque de terapia de profármaco con enzima dirigida, se administra una enzima dirigida / dirigida y un profármaco a un sujeto, en donde la enzima dirigida se localiza específicamente en una parte del cuerpo del sujeto donde convierte el profármaco en un fármaco activo. El profármaco se puede convertir en un fármaco activo en un solo paso (por la enzima objetivo) o en más de un paso. Por ejemplo, el profármaco puede convertirse en un precursor de un fármaco activo por la enzima objetivo. El precursor puede convertirse luego en el fármaco activo, por ejemplo, mediante la actividad catalítica de una o más enzimas dirigidas adicionales, una o más enzimas no dirigidas administradas al sujeto, una o más enzimas presentes de forma natural en el sujeto o Sitio objetivo en el sujeto (por ejemplo, una proteasa, fosfatasa, quinasa o polimerasa), por un agente que se administra al sujeto y / o por un proceso químico que no se cataliza enzimáticamente (por ejemplo, oxidación, hidrólisis, isomerización, epimerización, etc.).

[0157] Algunas realizaciones de la invención utilizan la terapia de profármacos enzimáticos dirigida a un agente de PNA, en la que un agente de PNA se une a una enzima y se inyecta en un sujeto, lo que resulta en la unión selectiva de la enzima a genes metastásicos o asociados a tumores. Posteriormente, se administra un profármaco al sujeto. El profármaco se convierte a su forma activa por la enzima solo dentro o cerca de las células cancerosas. La selectividad se logra por la especificidad de los agentes de PNA y retrasando la administración de profármacos hasta que haya un gran diferencial entre el cáncer y los niveles de enzimas en los tejidos normales. Las células cancerosas también pueden atacar con los genes que codifican enzimas activadoras de profármacos. Este enfoque se ha denominado terapia de profármacos con enzimas dirigidas por virus (VDEPT) o, más generalmente, GDEPT (terapia de profármacos con enzimas dirigidas por genes) y ha mostrado buenos resultados en sistemas de laboratorio. Otras versiones de la terapia con profármacos con enzimas dirigidas incluyen PDEPT (profármaco de enzimas dirigidas por polímero terapia), LEAPT (terapia de profármacos activados por enzimas dirigidas por lectina) y CDEPT (terapia de profármacos enzimáticos dirigidos por clostridios).

[0158] Los ejemplos no limitantes de combinaciones de enzima / profármaco / fármaco activo adecuadas para uso en la presente invención se describen, por ejemplo, en Bagshawe et al., *Current Opinions in Immunology*, 1999, 11: 579-583; Wilman, "Prodrugs in Cancer Therapy", *Biochemical Society Transactions*, 14: 375-382, 615th Meeting, Belfast, 1986; Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach To Targeted Drug Delivery", in "Directed Drug Delivery", Borchardt et al., (Eds), pp. 247-267 (Humana Press, 1985). Los ejemplos no limitantes de combinaciones de enzima / profármaco / fármaco activo contra el cáncer se describen, por ejemplo, en Rooseboom et al., *Pharmacol. Reviews*, 2004, 56: 53-102.

[0159] Los ejemplos de enzimas activadoras de profármacos incluyen, pero no se limitan a, nitrorreductasa, citocromo P450, purina-nucleósido fosforilasa, timidina quinasa, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, carboxipeptidasa, penicilina amidasa, β -lactamasa, citosina desaminasa y metionina γ -liasa.

[0160] Ejemplos de medicamentos anticancerígenos que pueden formarse *in vivo* por activación de un profármaco por una enzima activadora de profármaco incluyen, pero no se limitan a, 5- (aziridin-1-il) -4-hidroxi-amino-2-nitro-benzamida, isofosforamida mostaza, fosforamida mostaza, 2-fluoroadenina, 6-metilpurina, ganciclovir-trifosfato nucleótido, etopósido, mitomicina C, p- [N, N-bis (2-cloroetil) amino] fenol (POM), doxorubicina, oxazolidinona, 9-aminocamptotecina, mostaza, metotrexato, mostaza de ácido benzoico, adriamicina, daunomicina, carminomicina, bleomicinas, esperamicinas, melphalan, palitoxina, hidrazida de ácido 4-desacetilvinblastina-3-carboxílico, mostaza fenilendiamina, 4'-carboxifalato (1,2-ciclohexanodiamina) platino, taxol, 5-fluorouracilo, metilselenol y difluoruro de carbonotiónico.

[0161] En algunas realizaciones, un agente terapéutico (por ejemplo, anti-cáncer) comprende un conjugado de uno o más agentes de PNA y un agente anti-angiogénico. Los agentes anti-angiogénicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier molécula, compuesto o factor que bloquee, inhiba, desacelere o reduzca el proceso de angiogénesis, o el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos al desarrollarse a partir de vasos preexistentes. Dicha molécula, compuesto o factor puede bloquear la angiogénesis al bloquear, inhibir, ralentizar o reducir cualquiera de las etapas involucradas en la angiogénesis, incluidas (entre otras) las etapas de (1) la disolución de la membrana del vaso de origen, (2) migración y proliferación de células endoteliales, y (3) formación de nueva vasculatura por células migratorias.

[0162] Los ejemplos de agentes anti-angiogénicos incluyen, pero no se limitan a, bevacizumab (AVASTIN®), celecoxib (CELEBREX®), endostatina, talidomida, EMD121974 (Cilengitide), TNP-470, escalamina, combretastatina A4, interferón- α , anti- Anticuerpo VEGF, SU5416, SU6668, PTK787 / 2K 22584, Marimistal, AG3340, COL-3, Neovastat y BMS-275291.

Administración

[0163] Los agentes de PNA de acuerdo con la invención y las composiciones farmacéuticas de la presente invención

pueden administrarse de acuerdo con cualquier vía y régimen apropiados. En algunas realizaciones, una ruta o régimen es uno que se ha correlacionado con un beneficio terapéutico positivo.

5 **[0164]** En algunas realizaciones, la cantidad exacta administrada puede variar de un sujeto a otro, dependiendo de uno o más factores como es bien conocido en las técnicas médicas. Tales factores pueden incluir, por ejemplo, una o más de las especies, la edad, el estado general del sujeto, la composición particular que se administrará, su modo de administración, su modo de actividad, la gravedad de la enfermedad; la actividad de los agentes de PNA específicos empleados; la composición farmacéutica específica administrada; la vida media de la composición después de la administración; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención será decidido por un médico asistente dentro del alcance de un buen juicio médico.

15 **[0165]** Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía, como apreciarán los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran por vía oral (PO), intravenosa (IV), intramuscular (IM), intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea (SQ), intraventricular, transdérmica, interdérmica, intradérmica, rectal (PR), vaginal, intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), tópica (*p.ej.*, por polvos, pomadas, cremas, geles, lociones y / o gotas), mucosa, intranasal, bucal, enteral, vítreo, sublingual; por instilación intratraqueal, instilación bronquial y / o inhalación; como un aerosol oral, aerosol nasal y / o aerosol, y / o a través de un catéter de la vena porta.

25 **[0166]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA de acuerdo con la presente invención y / o composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse por vía intravenosa, por ejemplo, por infusión intravenosa. En algunas realizaciones, los agentes de PNA de acuerdo con la presente invención y / o composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse por inyección intramuscular. En algunas realizaciones, los agentes de PNA de acuerdo con la presente invención y / o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse mediante inyección intratumoral. En algunas realizaciones, los agentes de PNA de acuerdo con la presente invención y / o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse mediante inyección subcutánea. En algunas realizaciones, los agentes de PNA de acuerdo con la presente invención y / o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse a través de un catéter de vena porta. Sin embargo, la invención abarca la administración de agentes de PNA de acuerdo con la presente invención y / o las composiciones farmacéuticas de los mismos mediante cualquier ruta apropiada, teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias de la administración de fármacos.

35 **[0167]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA de acuerdo con la presente invención y / o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse a niveles de dosificación suficientes para administrar de aproximadamente 0,001 mg / kg a aproximadamente 100 mg / kg, de aproximadamente 0,01 mg / kg a aproximadamente 50 mg / kg, de aproximadamente 0,1 mg / kg a aproximadamente 40 mg / kg, de aproximadamente 0,5 mg / kg a aproximadamente 30 mg / kg, de aproximadamente 0,01 mg / kg a aproximadamente 10 mg / kg, de aproximadamente 0,1 mg / kg a aproximadamente 10 mg / kg, o de aproximadamente 1 mg / kg a aproximadamente 25 mg / kg de peso corporal del sujeto por día para obtener el efecto terapéutico deseado. La dosis deseada se puede administrar más de tres veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, día por medio, cada tercer día, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada dos meses, cada seis meses, o cada doce meses. En algunas realizaciones, la dosis deseada puede administrarse utilizando múltiples administraciones (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

Aplicaciones profilácticas

50 **[0168]** En algunas realizaciones, los agentes de PNA de acuerdo con la invención pueden utilizarse para aplicaciones profilácticas. En algunas realizaciones, las aplicaciones profilácticas implican sistemas y métodos para prevenir, inhibir la progresión y / o retrasar la aparición del cáncer u otro trastorno, y / o cualquier otra afección asociada con el gen en individuos susceptibles y / o mostrar síntomas de cáncer u otro desorden.

Terapia de combinación

55 **[0169]** Se apreciará que los agentes de PNA y sus conjugados terapéuticamente activos de acuerdo con la presente invención y / o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden emplearse en terapias de combinación para ayudar en el diagnóstico y / o tratamiento. "En combinación" no pretende implicar que los agentes deben administrarse al mismo tiempo y / o formularse para su administración conjunta, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la invención. Las composiciones pueden administrarse simultáneamente, antes o después de

una o más terapias o procedimientos médicos deseados. Se apreciará que los agentes terapéuticamente activos utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, cada agente se administrará en una dosis y / o en un horario determinado para ese agente.

5

[0170] La combinación particular de terapias (por ejemplo, terapias o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de las terapias y / o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desea lograr. También se apreciará que las composiciones farmacéuticas de los agentes de PNA descritos en el presente documento pueden emplearse en terapias de combinación (por ejemplo, terapias de quimioterapia de combinación), es decir, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse simultáneamente con, antes o después de, uno o más procedimientos terapéuticos y / o quimioterapéuticos deseados diferentes.

10

[0171] Los agentes de PNA, o una composición farmacéuticamente aceptable de los mismos, pueden administrarse en combinación con agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer primario o metastásico. En algunas realizaciones, un ingrediente activo es un agente quimioterapéutico como, por ejemplo, adriamicina, dexametasona, vincristina, ciclofosfamida, fluorouracilo, topotecan, taxol, interferones, derivados del platino, taxano (por ejemplo paclitaxel), alcaloides de la vinca (por ejemplo, , vinblastina), antraciclinas (p. ej., doxorubicina), epipodofilotoxinas (p. ej., etopósido), cisplatino, metotrexato, actinomicina D, actinomicinas D, dolastatina 10, colchicina, emetina, trimetrexato, metoprina, ciclosporina, daunorubicina, tenipósido, anfotericina, agentes alquilantes (p. ej., clorambucilo), 5-fluorouracilo, camptotecina, cisplatino, metronidazol, imatinib, Gleevec™, sunitinib y Sutent™ y combinaciones de los mismos.

15

20

[0172] En algunas realizaciones, los agentes de PNA, conjugados de los mismos, o una composición farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran en combinación con un agente antiproliferativo o quimioterapéutico seleccionado de uno cualquiera o más de Abarelix, aldesleukin, Aldesleukin, Alemtuzumab, Alitretinoin, Allopurinol, Altretamine, Amifostine Anastrozol, Trióxido de arsénico, Asparaginasa, Azacitidina, BCG Live, Bevacuzimab, Avastin, Fluorouracilo, Bexaroteno, Bleomicina, Bortezomib, Busulfán, Calusterona, Capecitabina, Camptothecin, Carboplatin, Carmustina, Celecoxib, Cetuximab, Chlorambucil, Cisplatino, Cladribina, Clofarabina, Ciclofosfamida, Citarabina, Dactinomicina, Darbepoyetina alfa, Daunorubicina, Desnileucina, Dexrazoxano, Docetaxel, Doxorubicina (neutra), Clorhidrato de Doxorubicina, Dromostanolona propionato, Epirubicina, Epoetina alfa, Erlotinib, Estramustina, Etopósido, Exemestano, Filgrastim, floxuridina fludarabina, Fulvestrant, Gefitinib, Gemcitabina, Gemtuzumab, Goserelin acetato, Histrelin acetato, Hidroxiurea, Ibritumomab, Idarubicin, Ifosfamide, mesilato de Imatinib, Interferón Alfa-2a, Interferón Alfa-2b, Irinotecan, Lenalidomida, Letrozol, Leucovorina, Leuprolide Acetate, Levamisol, Lomustine, Megestrol Acetato, Melfalán, mercaptopurina, 6-MP, Mesna, metotrexato, metoxaleno, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nandrolona, Nelarabina, Nofetumomab, Oprelvekin, Oxaliplatino, Paclitaxel, Palifermin, Pamidronate, Pegademasa, Pegaspargasa, Pegfilgrastim, Pemetrexed Disodio, Pentostatina, Pipobroman, Plicamicina, Sodio Porfímero, Procarbazona, Quinacrina, Rasburicasa, Rituximab, Sargramostim, Sorafenib, Estreptozocina, Maleato de Sunitinib, Talco, Tamoxifeno, Temozolomida, Tenipósido, VM-26, Testolactona, Tioguanina, 6-TG, Tiotepa, Topotecan, Toremifeno, Tositumomab, Trastuzumab, Tretinoína, ATRA, mostaza de Uracilo, Valrubicina, Vinblastina, Vincristina, Vinorelbina, Zoledronato o ácido zoledrónico.

25

30

35

40

[0173] La combinación particular de terapias a emplear en un régimen de combinación generalmente tendrá en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y / o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que se va a lograr. También se apreciará que las terapias y / o quimioterapia empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un antígeno de la invención puede administrarse simultáneamente con otro fármaco quimioterapéutico o neurológico), o pueden lograr efectos diferentes. Se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo propósito (por ejemplo, los agentes de PNA útiles para tratar, prevenir y / o retrasar la aparición de cáncer u otro trastorno pueden administrarse simultáneamente con otro agente útil para tratar, previniendo y / o retrasando la aparición de cáncer o trastornos), o pueden lograr diferentes efectos (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). La invención abarca el suministro de composiciones farmacéuticas en combinación con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducir y / o modificar su metabolismo, inhibir su excreción y / o modificar su distribución dentro del cuerpo.

45

50

[0174] En algunas realizaciones, los agentes utilizados en combinación se utilizarán en niveles que no excedan los niveles en los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación serán más bajos que los utilizados individualmente.

55

[0175] En algunas realizaciones, la terapia de combinación puede implicar la administración de una pluralidad de agentes de PNA dirigidos a un solo gen. En algunas realizaciones, la terapia de combinación puede comprender una pluralidad de agentes de PNA que reconocen distintas secuencias de genes.

60

Kits

[0176] En el presente documento se describen adicionalmente, una variedad de kits para llevar a cabo de manera conveniente y / o efectiva los métodos de acuerdo con la presente invención. Los kits típicamente comprenden uno o más agentes de PNA.

5 [0177] Se describe aquí que, los kits para uso pueden incluir una o más muestras de referencia; instrucciones (por ejemplo, para procesar muestras, para realizar pruebas, para interpretar resultados, para administrar agentes de PNA, para el almacenamiento de agentes de PNA, etc.); tampones y / u otros reactivos necesarios para realizar pruebas. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender paneles de agentes de PNA. Otros componentes de los kits
10 pueden incluir células, medios de cultivo celular, tejidos y / o medios de cultivo de tejidos.

[0178] Se describe en la presente memoria que los kits pueden incluir varias dosis unitarias de una composición farmacéutica que comprende agentes de PNA. Se puede proporcionar una ayuda de memoria, por ejemplo, en forma de números, letras y / u otras marcas y / o con un inserto de calendario, designando los días / horas en el programa de tratamiento en el que se pueden administrar las dosis. Se pueden incluir dosis de placebo y / o suplementos dietéticos de calcio, ya sea en una forma similar o distinta de las dosis de las composiciones farmacéuticas, para proporcionar un kit en el que se toma una dosis todos los días.
15

[0179] Los kits pueden comprender uno o más recipientes o recipientes, de modo que algunos de los componentes o reactivos individuales pueden alojarse por separado. Los kits pueden comprender un medio para encerrar los contenedores individuales en confinamiento relativamente cercano para la venta comercial, por ejemplo, una caja de plástico, en la que se pueden incluir instrucciones, materiales de embalaje como espuma de poliestireno, etc.
20

[0180] Además, se describe en el presente documento que se pueden usar kits en el tratamiento, diagnóstico y / o profilaxis de un sujeto que padece y / o es susceptible de cáncer u otro trastorno. En algunas realizaciones, tales kits comprenden (i) al menos un agente de PNA; (ii) una jeringa, aguja, aplicador, etc. para la administración de al menos un agente de PNA a un sujeto; y (iii) instrucciones de uso.
25

[0181] Estos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán adicionalmente considerando los siguientes Ejemplos, que pretenden ilustrar ciertas realizaciones particulares de la invención, pero no pretenden limitar su alcance, como se define en las reivindicaciones.
30

Ejemplos**Detalles generales****35 Ejemplo 1: Inhibición de la expresión de BRAF usando ácidos nucleicos peptídicos (PNA)*****Cultivo de células***

[0182] El presente ejemplo demuestra el efecto sobre la viabilidad celular de derivados de PNA específicos para mutantes de BRAF. Los compuestos de PNA dirigidos a la mutación del gen BRAF V600E se analizaron frente a líneas celulares de melanoma que son BRAF de tipo salvaje (C918) o BRAF V600E mutante (OCM1A y SK-MEL 7). C918 y OCM1A son líneas celulares de melanoma uveal, mientras que SK-MEL 7 es una línea celular de melanoma cutáneo. C918 fue proporcionado amablemente por Robert Folberg (Universidad de Illinois, Chicago, IL). OCM1A era del Dr. William Harbor (Washington University, St. Louis, MO). SK-MEL 7 fue de Alan Houghton (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY). Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de FBS, 100 unidades / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomina y se mantuvieron a 37 ° C en 5% de CO₂.
40

45 *Ensayos de viabilidad celular.*

[0183] Los compuestos de PNA dirigidos a la mutación del gen BRAF V600E se probaron contra líneas celulares de melanoma que son BRAF de tipo natural (C918) o mutante BRAF V600E (OCM1A y SK-MEL 7). C918 y OCM1A son líneas celulares de melanoma uveal, mientras que SK-MEL 7 es una línea celular de melanoma cutáneo. Dos derivados de PNA en particular, (A) I-292-3 L2LP NHAc y (B) I-292-9 L2 NHAc, mostraron una supresión significativa de la viabilidad y especificidad celular para las líneas celulares que tienen la mutación del gen objetivo, OCM1A y SK-MEL7. Las células se trataron con dosis crecientes de varios derivados de PNA durante 72 horas, después de lo cual se midió la viabilidad celular y se calculó en relación con las células no tratadas. Las células se colocaron en placas de 96 pocillos y se trataron por triplicado con las concentraciones indicadas de derivado de PNA. La viabilidad se evaluó después de 72 horas de tratamiento utilizando el kit de conteo celular 8 (CCK8) de Dojindo Molecular
50

Technologies de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La supervivencia se expresa como un porcentaje de células no tratadas, mostrando una captación estancada <10% ID / g en todos los puntos de tiempo (24-120 horas p.i.), posiblemente debido a una mayor permeación y retención de la vasculatura con fugas del tumor. Como se muestra en **Figura 2**, células tratadas con los derivados de PNA I-292-3 L2LP NHAc (como se ve en **FIG. 2A**) y I-292-9 L2 NHAc (como se ve en **FIG. 2B**) mostraron una supresión significativa de la viabilidad y especificidad celular para las líneas celulares (OCM1A y SK MEL 7) que tienen la mutación del gen diana. El derivado de PNA I-292-3 L2LP NHAc inhibió el crecimiento de las células SK MEL 7 en un 100%. El derivado de PNA I-292-3 L2LP NHAc inhibió el crecimiento celular de OCM1A en un 96.7%. La incubación de células SK MEL 7 y OCM1A con I-292-3 L2LP NHAc causó una disminución de 62.4% y 40.3% (respectivamente) en la expresión de BRAF, según se determinó mediante transferencia Western. La especificidad se observa a dosis más bajas en las que la viabilidad celular de las células mutantes se redujo al 20% o menos con el tratamiento con 750 nM del derivado de PNA, mientras que la viabilidad de las células C918 se mantuvo alrededor del 100%. Esto demuestra que los derivados de PNA son eficaces para suprimir la viabilidad celular y son específicos para genes con la mutación BRAF objetivo.

Immunotransferencia

[0184] Las células se trataron durante 24, 48 y 72 horas de tratamiento con PNA 750 nM y se lisaron en un tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) suplementado con tabletas de cóctel inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics) y 1 mmol / L de Na₃VO₄. Se cargaron cantidades iguales de proteína en geles de PAGE del 4% al 12% (Invitrogen). Las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se bloquearon con leche deshidratada al 5% y se sondaron con p-MEK, MEK, p-ERK 1/2 (T202 / Y204), ERK 1/2, PARP escindida, α-tubulina (Tecnología de señalización celular), BRAF (Biotecnología de Santa Cruz), LC3 (Novus Biologicals) y BRAF V600E (Spring Bioscience).

[0185] La **figura 3** describe el mutante BRAF y la expresión de la proteína de tipo salvaje BRAF en células de melanoma (C918 y OCM1A) tratadas con 750 nM del PNA I-292-3 L2LP NHAc durante 24, 48 o 72 horas. **FIG. 3A** representa la medición de la expresión de la proteína BRAF mutante y total medida por transferencia de Western en células C918 y OCM1A. La expresión de tubulina también se midió como un control de carga. El BRAF de tipo salvaje se encuentra tanto en el tipo salvaje como en las líneas celulares mutantes, mientras que el mutante BRAF V600E solo se encontró en células mutantes. La expresión de la proteína BRAF mutante se reduce con el tiempo en las células tratadas con el derivado de PNA. No se observó proteína BRAF mutante en las células C918 ya que es una línea celular de tipo salvaje. **FIG. 3B** describe la expresión disminuida de la proteína mutante BRAF V600E en líneas celulares OCM1A (mutante BRAF) durante 72 horas de tratamiento con el derivado de PNA I-292-3 L2LP NHAc. No se observó expresión de BRAF mutante en células C918. **FIG. 3C** muestra que no hubo una reducción significativa de la proteína de tipo salvaje BRAF total durante 72 horas en las células OCM1A (mutantes) y C918 (de tipo salvaje) tratadas con I-292-3 L2LP NHAc. Estos resultados se correlacionan con la especificidad y la supresión de la viabilidad observada en los estudios de viabilidad celular. **Figura 3** demuestra que los derivados de PNA son eficaces para suprimir la viabilidad celular y son específicos para genes con la mutación BRAF objetivo. ND = no tratado.

[0186] La **Figura 4** describe el mutante BRAF y la expresión de la proteína de tipo salvaje BRAF en células de melanoma (C918 y OCM1A) tratadas con 750 nM del PNA I-292-9 L2 NHAc durante 24, 48 o 72 horas. **FIG. 4A** representa la medición de la expresión de la proteína BRAF mutante y total medida por transferencia de Western en células C918 y OCM1A. La expresión de tubulina también se midió como un control de carga. El BRAF de tipo salvaje se encuentra tanto en el tipo salvaje como en las líneas celulares mutantes, mientras que el mutante BRAF V600E solo se encuentra en las células mutantes. La expresión de la proteína BRAF mutante se reduce con el tiempo en las células tratadas con el derivado de PNA. No se observó proteína BRAF mutante en las células C918 ya que es una línea celular de tipo salvaje. **FIG. 4B** describe la expresión disminuida de la proteína mutante BRAF V600E en líneas celulares OCM1A (mutante BRAF) durante 72 horas de tratamiento con el derivado de PNA I-292-9 L2 NHAc. No se observó expresión de BRAF mutante en células C918. **FIG. 4C** muestra que no hubo una reducción significativa en la proteína de tipo salvaje BRAF total durante 72 horas en células C918 (tipo salvaje) tratadas con I-292-9 L2 NHAc. Hubo una ligera disminución de la expresión de la proteína BRAF total en células OCM1A (mutantes), pero no en células C918 (tipo salvaje). Estos resultados también se correlacionan con la especificidad y la supresión de la viabilidad observada en los estudios de viabilidad celular. **Figura 4** demuestra que los derivados de PNA son eficaces para suprimir la viabilidad celular y son específicos para genes con la mutación BRAF objetivo. ND = no tratado.

PCR cuantitativa en tiempo real

[0187] Las células C918 y OCM1A se trataron con PNA 750 nM (I-292-3 L2LP) durante 48 horas. La expresión del ARNm de BRAF mutante en células se cuantificó utilizando RT-PCT. Específicamente, las células se trataron y luego se lisaron utilizando TRIzol Reagent® (Invitrogen). La transcripción inversa de 1 µg de ARN se realizó utilizando el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript III (Invitrogen). Se realizaron ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando el Sistema de PCR en tiempo real 7300 (Applied Biosystems). Se usaron ensayos de expresión génica TaqMan, que incluyen conjuntos de cebadores de sonda específicos del gen (Applied Biosystems), para detectar los genes indicados y el ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) / hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT). La expresión relativa de cada gen fue calculada por el método $\Delta\Delta C_T$.

Ver **Figura 5**. Las células de tipo salvaje para BRAF (C918), así como las líneas celulares mutantes (OCM1A y SK-Mel 7) se trataron durante 48 horas con 750 nM de I-292-3 L2LP NHAc. De acuerdo a **Figura 5A**, La expresión de ARNm de BRAF^{V600E} se cuantificó utilizando RT-PCR. Los valores de la cantidad relativa (RQ) se normalizaron con el control de carga de GAPDH y se establecieron en relación con la expresión del ARNm BRAF mutante en células OCM1A (ND) no tratadas. La expresión de ARNm de BRAF^{V600E} disminuyó significativamente en las células OCM1A cuando se trató con I-292-3 L2LP NHAc. De acuerdo a **Figura 5B**, la expresión de ARNm de ambos BRAF^{V600E} y BRAF total en células SK-Mel 7 se cuantificó utilizando RT-PCR. Los valores de RQ se normalizaron con GAPDH y se establecieron en relación con las células no tratadas. En células SK-Mel 7, la expresión de ARNm de BRAF^{V600E} también disminuyó significativamente después del tratamiento con I-292-3 L2LP NHAc. No se observó una disminución en la expresión del ARNm de BRAF total como resultado del tratamiento. Los resultados de RT-PCT para la expresión del ARNm de BRAF mutante fueron consistentes con lo que se pudo ver en transferencias de Western que mostraron una expresión de proteína disminuida **Figuras 3 y 4**.

Ensayos de ratón de xenoinjerto

[0188] Se inocularon ratones atímicos (3 por grupo) con OCM1A. Después de 15 días, el tamaño del tumor en desarrollo fue suficiente para una mayor medición y monitoreo. El grupo de tratamiento recibió una dosis de 50 mg / kg de I-292-3 L2LP-NHAc en los días 15, 17, 20 y 22. Como se vio en **Figura 6A**, en el día 28, el tamaño promedio del tumor fue del 35% del grupo de control no tratado. Además, una semana después de la última dosis, el tamaño promedio del tumor del grupo tratado comenzó a reducirse en un 25% durante 4 días.

[0189] La toxicidad del derivado de PNA analizado se evaluó midiendo la pérdida de peso de los animales de prueba. En las dosis utilizadas, el peso y la actividad del animal no cambiaron a lo largo del estudio de 28 días, como se vio en **Figura 6B**. Estos resultados se correlacionan bien con la falta de toxicidad observada en estudios in vitro previos.

[0190] El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering y el Centro de Recursos de Investigación para Animales aprobaron específicamente este estudio. El estudio también cumplió con los principios de Laboratory Animal Care (publicación NIH n° 85-23, publicado en 1985). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal.

Alcance

[0191] En las reivindicaciones, los artículos tales como "un", "el" y "la" pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o, de lo contrario, se desprenda del contexto. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos, y la referencia a "la célula" incluye una referencia a una o más células conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, empleados o, de lo contrario, relevantes para un producto o proceso determinado, a menos que se indique lo contrario o sea evidentes por el contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, empleado o de otro modo relevante para un producto o proceso dado. La invención incluye realizaciones en las que más de uno, o todos los miembros del grupo se presentan, emplean o son relevantes para un producto o proceso dado. Además, debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que depende de otra reivindicación puede modificarse para incluir una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación base. Además, cuando las reivindicaciones recitan una composición, debe entenderse que se incluyen los métodos de uso de la composición para cualquiera de los propósitos descritos en el presente documento, y los métodos para elaborar la composición de acuerdo con cualquiera de los métodos para divulgar el presente documento u otros métodos conocidos en la técnica se incluyen, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto en la materia que surgiría una contradicción o incoherencia.

[0192] Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en el formato de grupo de Markush, debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se revela, y cualquier elemento(s) se puede eliminar del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a la invención, o aspectos de la invención, que comprenden elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Para fines de simplicidad, dichas realizaciones no se han expuesto específicamente en el presente documento. Se observa que el término "que comprende" pretende ser abierto y permite la inclusión de elementos o pasos adicionales.

[0193] Donde se dan los rangos, se incluyen los puntos finales. Además, debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto y comprenda a alguien con experiencia en la técnica, los valores que se expresan como rangos pueden asumir cualquier valor o sub-rango específico dentro de los rangos de estado en

diferentes realizaciones de la invención, a la décima parte de la unidad del límite inferior del rango, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 **[0194]** Además, debe entenderse que cualquier realización particular de la presente invención que cae dentro de la técnica anterior puede excluirse explícitamente de una o más de las reivindicaciones. Dado que tales realizaciones se consideran conocidas por un experto en la técnica, pueden excluirse incluso si la exclusión no se establece explícitamente en el presente documento. Cualquier realización particular de las composiciones de la invención puede excluirse de una o más de las reivindicaciones, por cualquier razón, relacionada o no con la existencia de la técnica anterior.

10 **[0195]** Las publicaciones mencionadas anteriormente y en todo el texto se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anticipar dicha divulgación en virtud de una divulgación previa.

15

REIVINDICACIONES

1. Un agente de PNA que comprende:
un resto de PNA; y
un primer péptido catiónico e hidrófobo en el extremo N del resto de PNA, en el que el primer péptido comprende
residuos de lisina y al menos uno de los residuos de lisina comprende un resto de cadena lateral de palmitoil; y
un segundo péptido catiónico e hidrófobo en el extremo C del resto de PNA, en el que el segundo péptido comprende
residuos de lisina, y al menos uno de los residuos de lisina comprende un resto de cadena lateral de palmitoil.
2. El agente de PNA de la reivindicación 1, en el que el primer péptido y / o el segundo péptido están constituidos por
residuos de lisina.
3. El agente de PNA de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el agente de PNA tiene una secuencia que
incluye menos de 60% de purinas.
4. El agente de PNA de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el agente de PNA comprende una secuencia
que se dirige a:
(i) un gen;
(ii) una secuencia de 13-20 nucleótidos de un gen con una complementariedad del 75% o más; o
(iii) una secuencia de 13-20 nucleótidos de un gen con completa complementariedad.
5. El agente de PNA de la reivindicación 4, en el que el gen es un oncogén.
6. El agente de PNA de la reivindicación 5, en el que el oncogén incluye un elemento de secuencia mutante y el
agente de PNA tiene una secuencia que se dirige a un sitio que comprende o consiste en el elemento de secuencia
mutante.
7. El agente de PNA de la reivindicación 6, en el que el agente de PNA se dirige a un sitio que comprende o que
consiste en una región de un oncogén BRAF que comprende una mutación correspondiente a una mutación V600E
en una proteína BRAF.
8. El agente de PNA de la reivindicación 5, en el que el agente de PNA se dirige a un sitio que comprende o consiste
en una región que comprende una unión de translocación de un oncogén.
9. El agente de PNA de la reivindicación 8, en el que el agente de PNA se dirige a un sitio que comprende o consiste
en una región de:
(i) una translocación MYB-NFIB que comprende una unión de los genes MYB y NFIB o fragmentos de los mismos; o
(ii) una translocación FUS-CHOP que comprende una unión de genes FUS y CHOP o fragmentos de los mismos.
10. El agente de PNA de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el agente de PNA tiene una secuencia que
se dirige a un sitio en un gen, cuyo agente de PNA se **caracteriza en que**, cuando un sistema que comprende una
célula que expresa el gen se expone al agente de PNA, la expresión del gen se reduce en una cantidad dentro del
rango de 50% a 100% cuando el agente de PNA está presente en comparación con otras condiciones comparables
cuando está ausente.
11. El agente de PNA de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el primer resto incluye un primer resto
catiónico y un primer resto hidrófobo, y el segundo resto incluye un segundo resto catiónico y un segundo resto
hidrófobo.
12. Una composición farmacéutica que comprende el agente de PNA de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un
vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que opcionalmente dicha composición se formula para:
(i) administración directa en un tejido diana;
(ii) administración oral;
(iii) administración parenteral;
(iv) administración intradérmica;
(v) administración transdérmica; o
(vi) administración por inhalación.

Figura 1 A

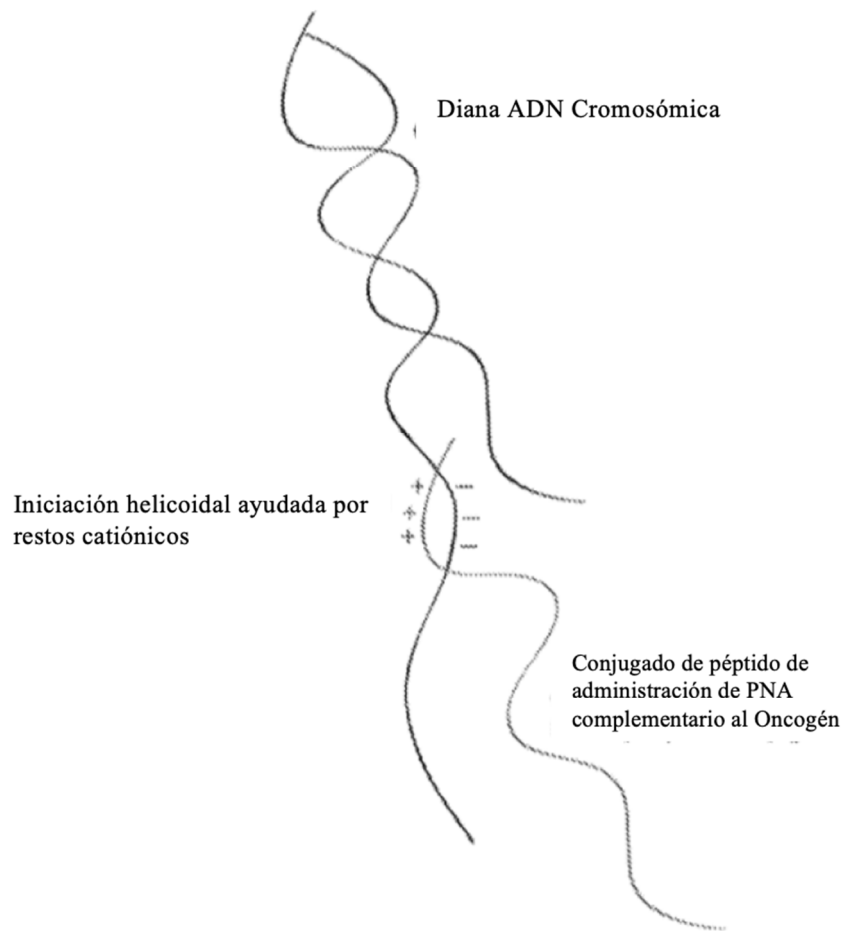


Figura 1 B

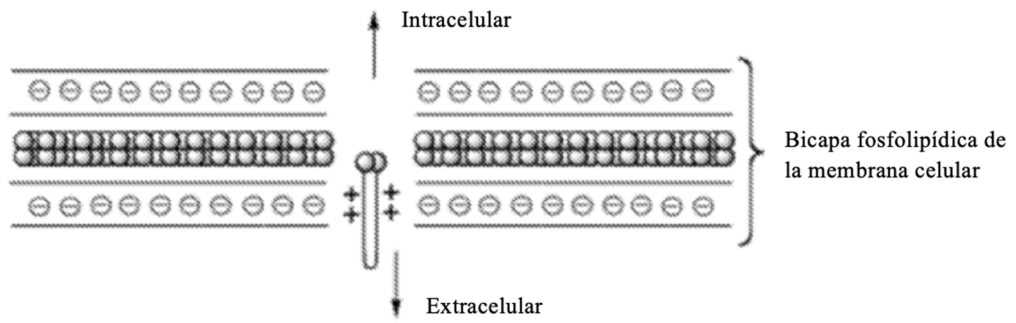


Figura 1 C

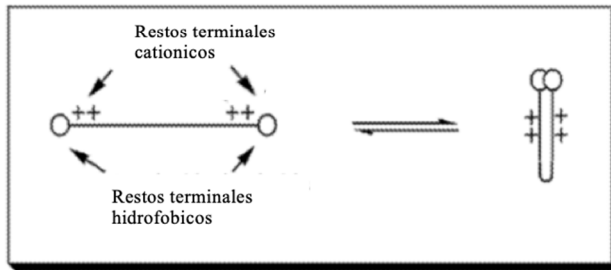


Figura 2A

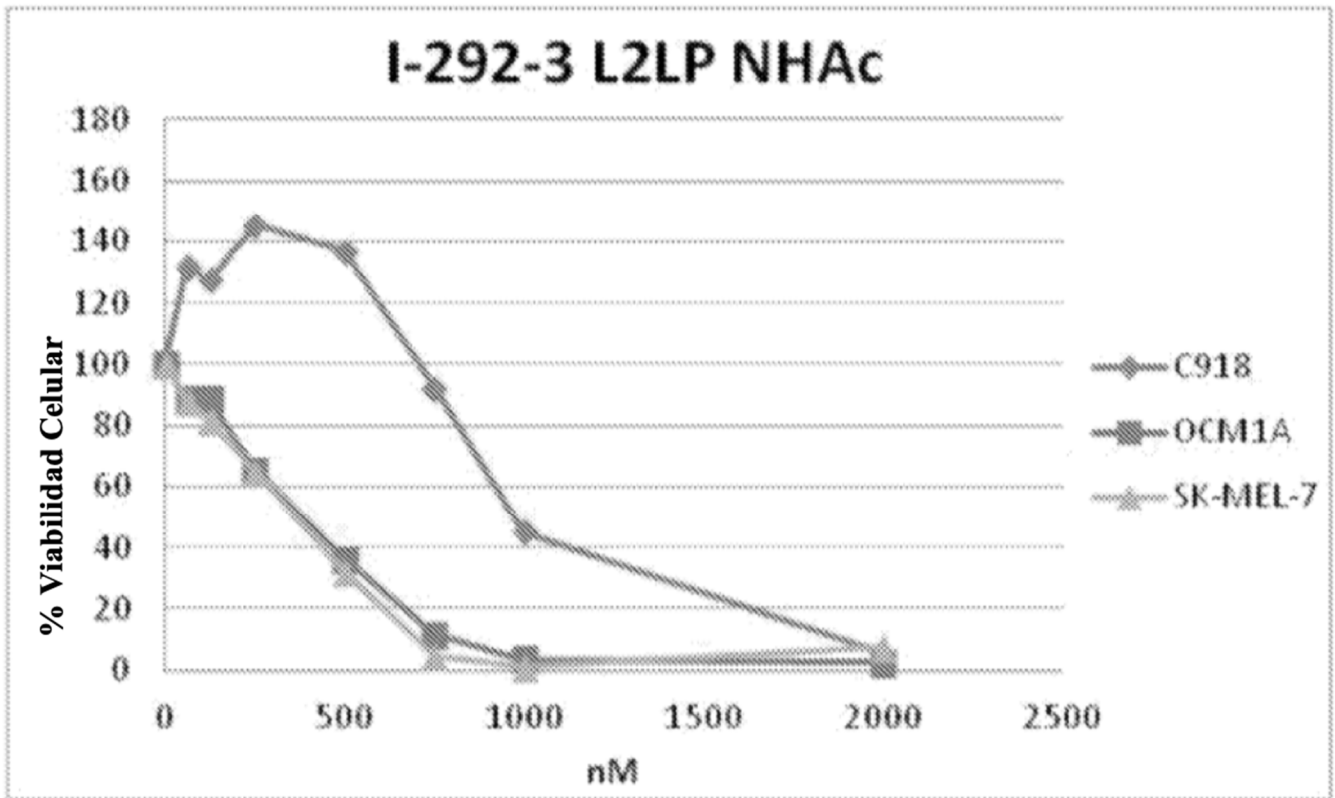


Figura 2B

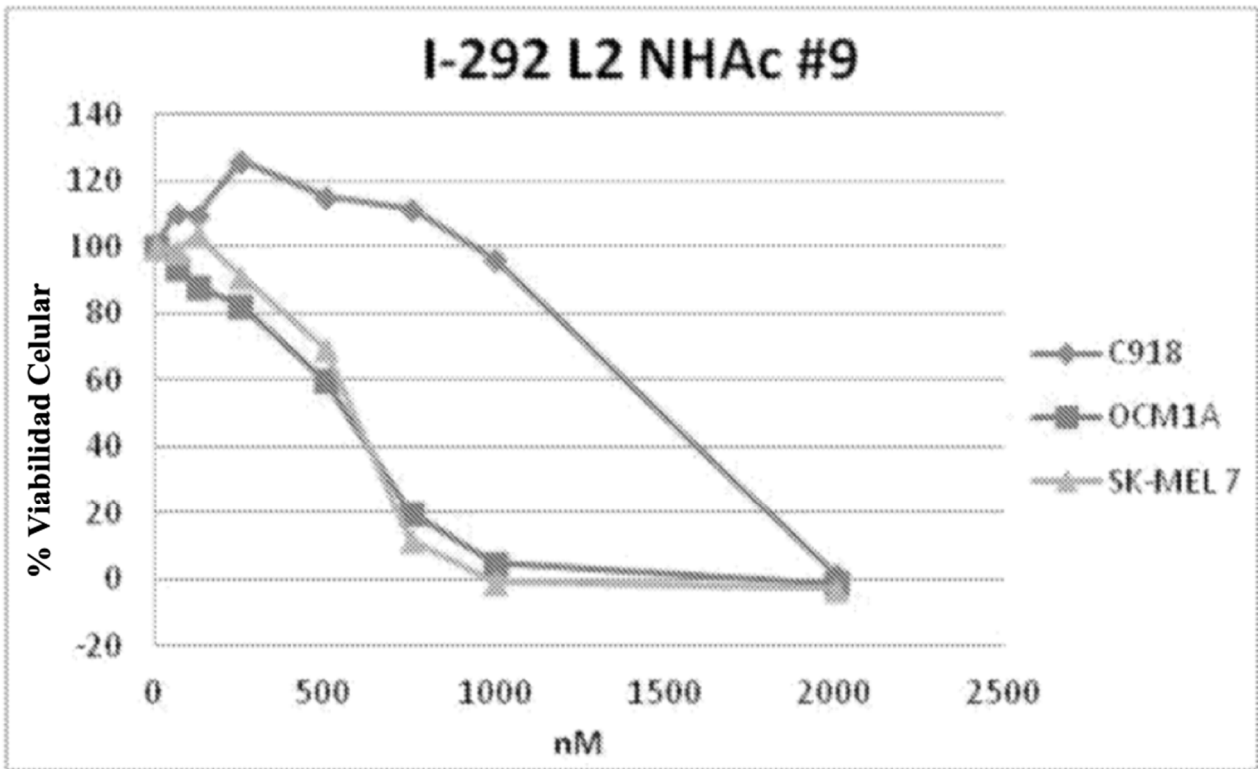


Figura 3A

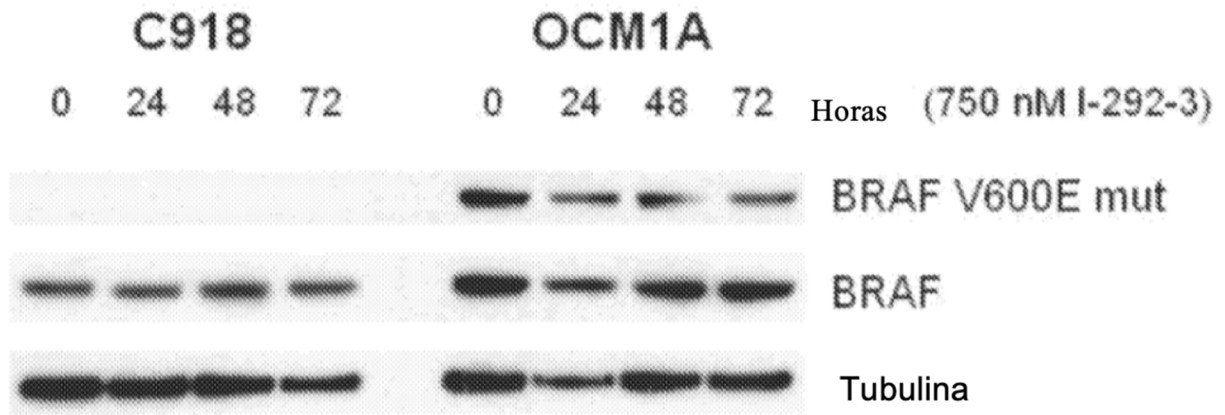


Figura 3B

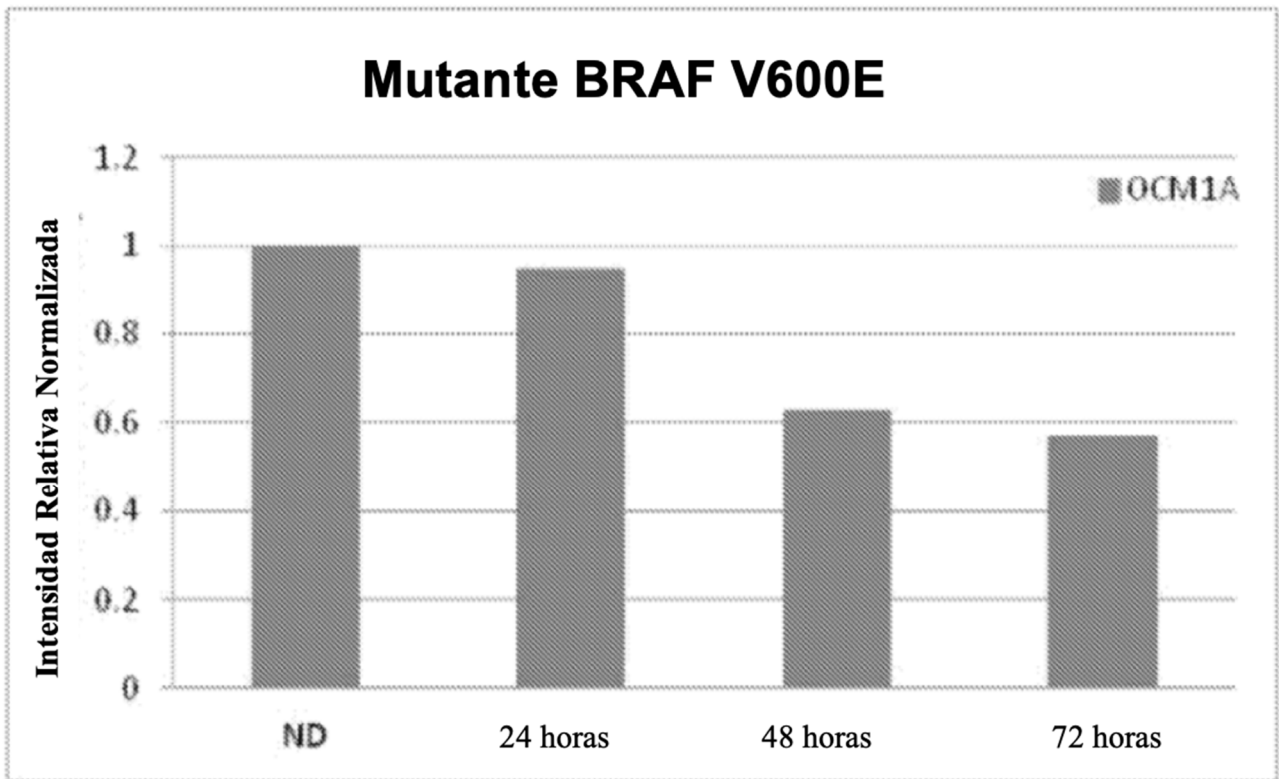


Figura 3C

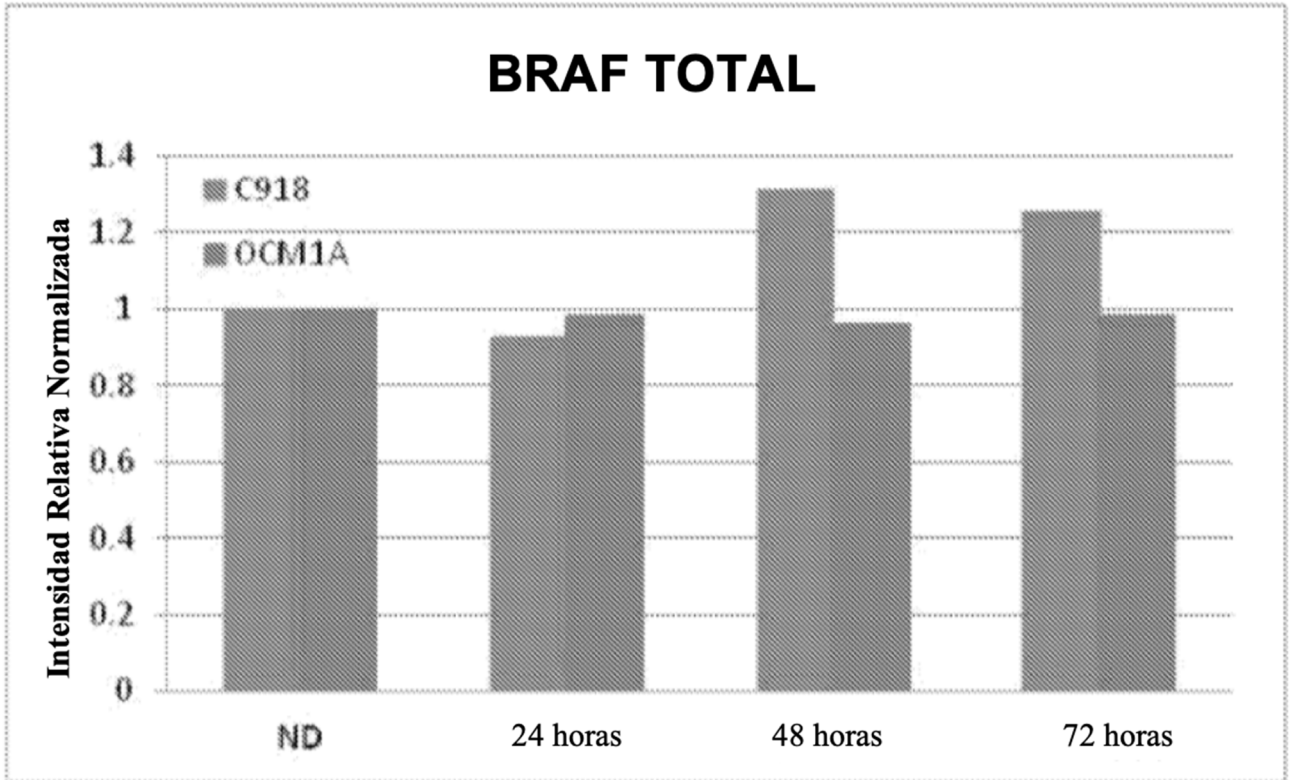


Figura 4A

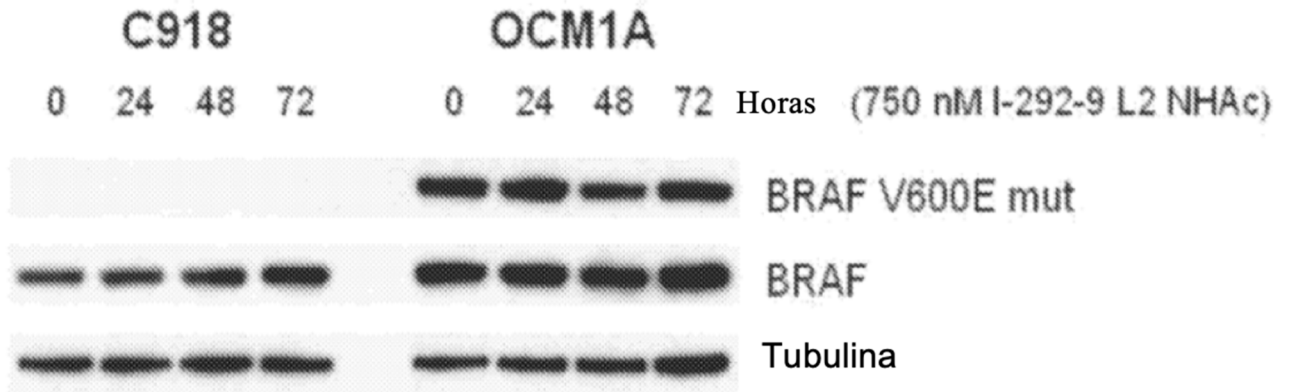


Figura 4B

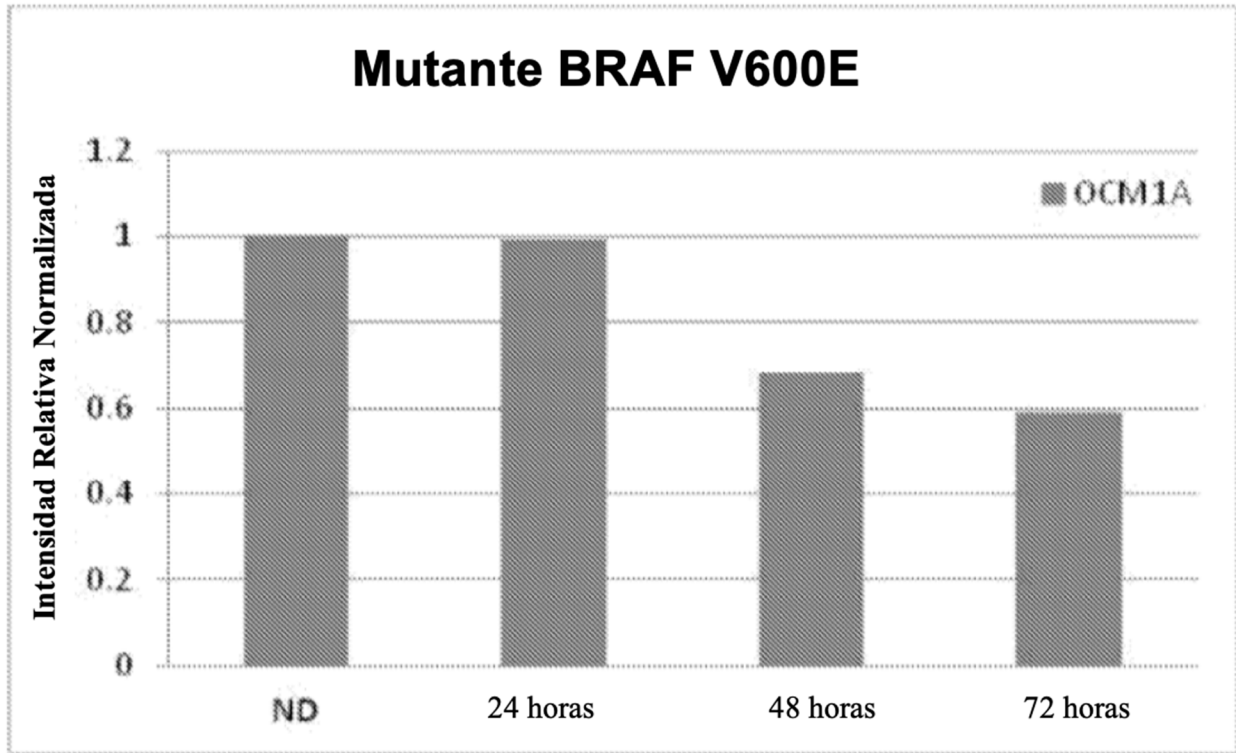


Figura 4C

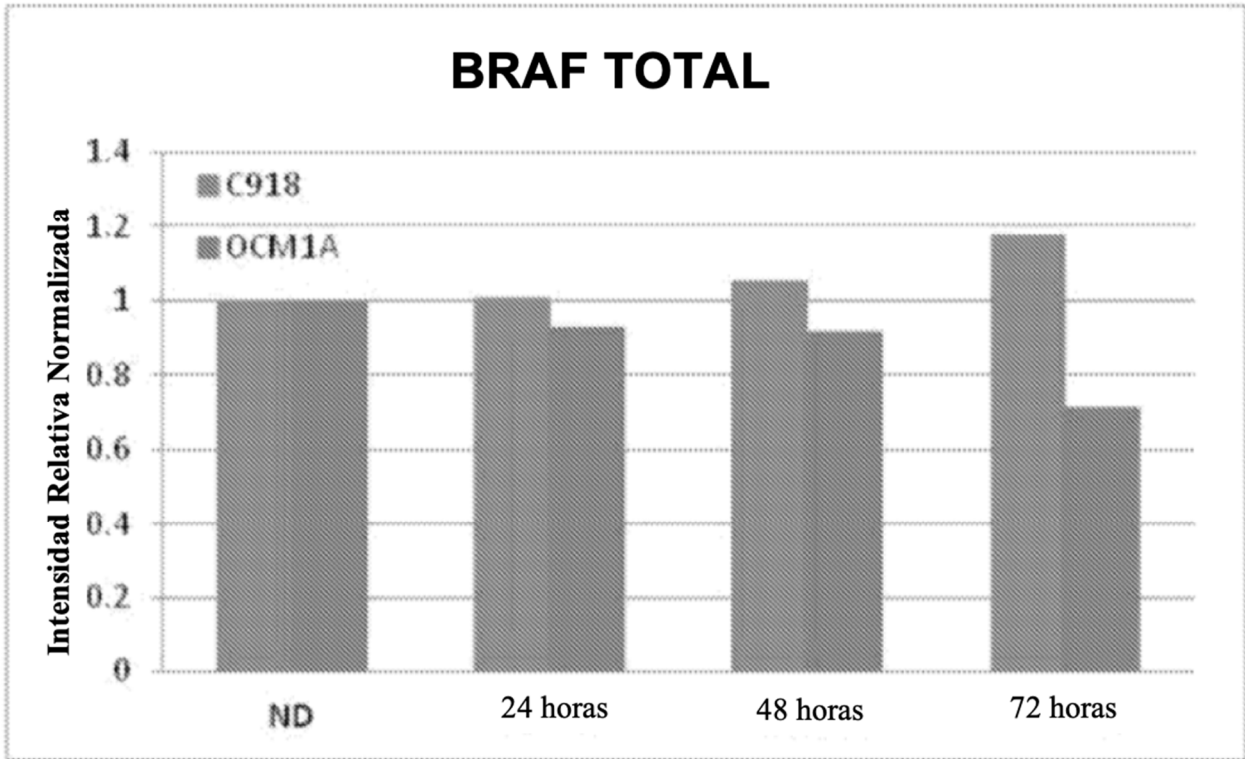


Figura 5A

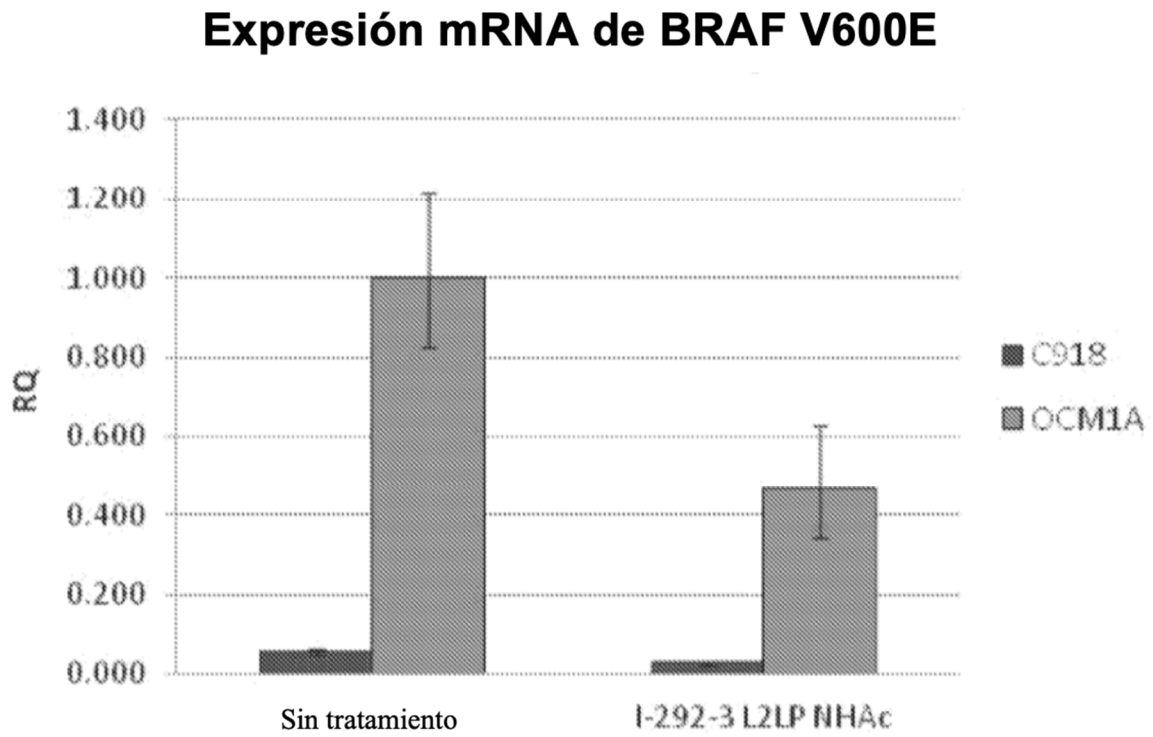


Figura 5B

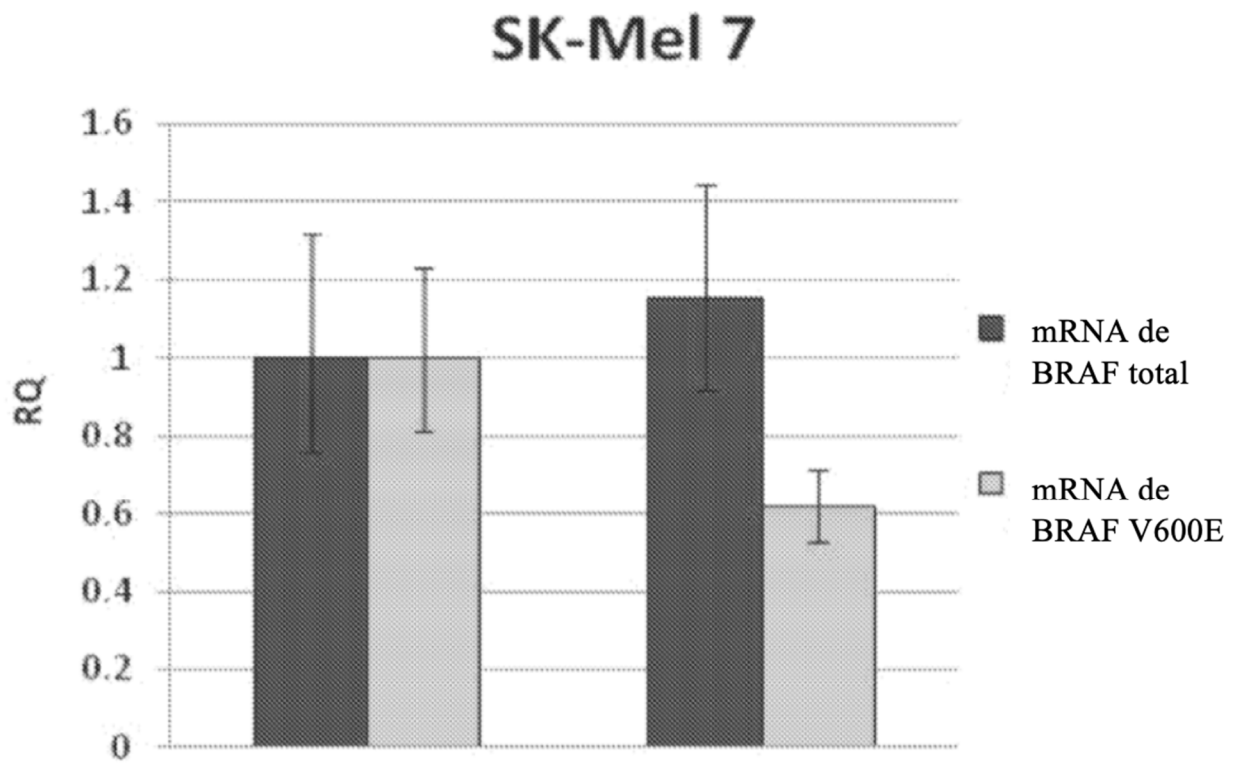


Figura 6A

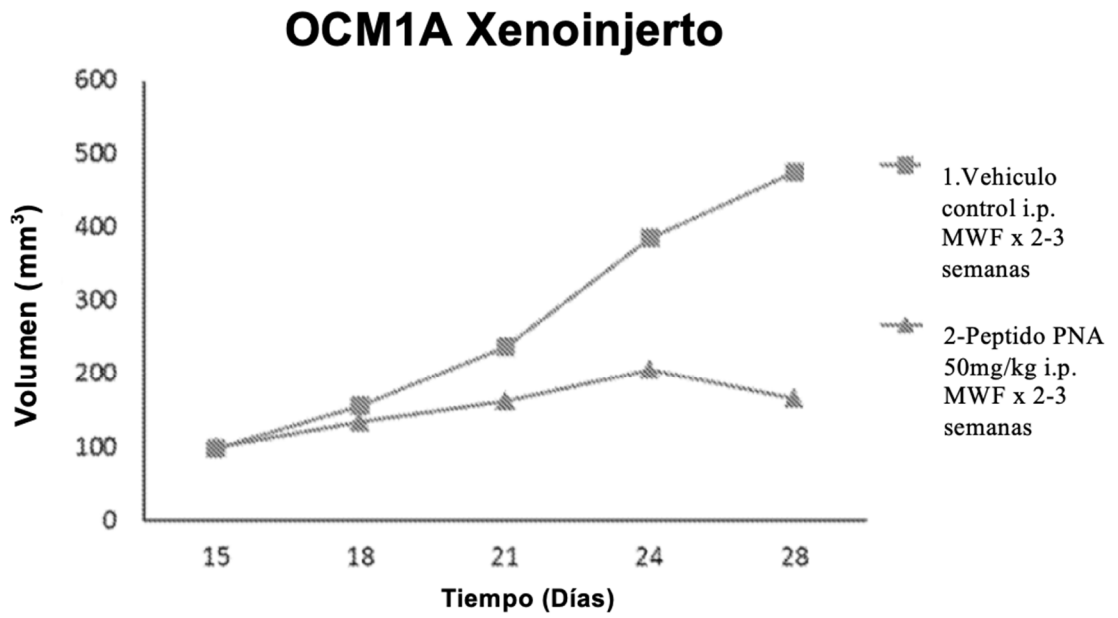


Figura 6B

