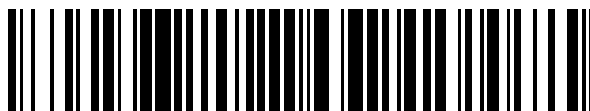


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 923**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2012 PCT/JP2012/063082**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12161196**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2012 E 12790050 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2716304**

54 Título: **Un liposoma que contiene una molécula de ARNhc que se dirige a una timidilato sintasa y uso del mismo**

30 Prioridad:
23.05.2011 JP 2011114946

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2018

73 Titular/es:
**DELTA-FLY PHARMA, INC. (100.0%)
37-2, Nishikino, Miyajima Kawauchi-cho
Tokushima-shi, Tokushima 771-0116, JP**

72 Inventor/es:
**ISHIDA, TATSUHIRO;
HUANG, CHENG-LONG y
WADA, HIROMI**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 653 923 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

Un liposoma que contiene una molécula de ARNhc que se dirige a una timidilato sintasa y uso del mismo

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un agente antitumoral, que comprende, como principio activo, un liposoma que contiene una molécula de ARNhc que se dirige a una timidilato sintasa, y al uso del mismo. En particular, la presente invención se refiere al uso de dicho agente antitumoral en combinación con un agente quimioterapéutico.

Antecedentes de la técnica

15 En los últimos años, las moléculas de ARNi que producen ARN de interferencia (denominado en lo sucesivo "ARNi") han ido ganando atención como herramientas útiles para el tratamiento de tumores y similares. Se ha desarrollado diversas moléculas de ARNi que pueden inhibir el crecimiento tumoral. Los presentes inventores informaron previamente sobre una molécula de ARNi que se dirige a la timidilato sintasa (denominada en lo sucesivo "TS") implicada en la síntesis de ADN. Además, los presentes inventores notificaron que la molécula de ARNi inhibe
20 significativamente la expresión de TS y, por lo tanto, presenta los efectos antitumorales, y que la molécula de ARNi potencia los efectos antitumorales de un agente antitumoral de 5-FU (y particularmente un fármaco compuesto de tegafur, gimeracil y oteracil potasio) (documento WO2010/113844).

25 Sin embargo, en general, las moléculas de ARNi se disgregan rápidamente tras la administración *in vivo*. Por lo tanto, ha sido muy difícil administrar moléculas de ARNi en cantidades suficientes para dirigirse a los tumores.

30 Con el fin de resolver los problemas anteriores, actualmente se está desarrollando diversos métodos de liberación de moléculas de ARNi. Por ejemplo, existe un método que comprende incorporar ADN que codifica una molécula de ARNi (y, particularmente, una molécula de ARNi que tiene estructura de horquilla corta (ARNhc)) en un vector adecuado y administrar el vector (documento WO2010/113844). Sin embargo, de acuerdo con este método, es necesario inyectar directamente el vector en un tumor para la administración. Con miras a la aplicación clínica, se ha estado esperando un método de administración más fácil (por ejemplo, de administración intravenosa). Además, se han desarrollado métodos para liberar moléculas de ARNi en células tumorales usando complejos (lipoplejos) preparados mezclando una molécula de ARNi con un liposoma (Qixin Leng et al., Drug Future, septiembre de 2009, 34(9), 721; Sherry Y. Wu et al., The AAPS Journal, Volumen 11, n.º 4, diciembre de 2009; y B. Ozpolat et al., Journal of Internal Medicine 267; 44-53 2009). Sin embargo, tras la administración repetitiva de dichos lipoplejos, los lipoplejos se atrapan rápidamente por las células de los sistemas inmunitarios de los cuerpos vivos a los que se han administrado los lipoplejos. En tal caso, no pueden obtenerse suficientes efectos del ARNi. Además, esta
35 administración puede producir efectos secundarios graves, lo cual supone un problema.

40 Por lo tanto, se sigue esperando en la técnica un método para liberar eficazmente moléculas de ARNi en tumores mediante administración *in vivo*.

Sumario de la invención

45 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la liberación *in vivo* conveniente y eficaz de ARNhc que se dirige a TS.

50 Como resultado de estudios profundos para solucionar los problemas anteriores, los presentes inventores descubrieron que, cuando un ARNhc capaz de inhibir la expresión de TS se une electrostáticamente a la superficie de un liposoma catiónico modificado con PEG, el ARNhc unido al liposoma puede liberarse fácilmente en células cancerosas. Además, los presentes inventores descubrieron que, cuando un liposoma catiónico modificado con PEG al que se ha unido ARNhc se usa en combinación con un agente quimioterapéutico y, particularmente, un agente antitumoral de 5-FU, puede mejorarse el direccionamiento a la célula cancerosa, lo cual permite mejorar
55 significativamente los efectos contra las células cancerosas. Además, los presentes inventores descubrieron que, cuando un liposoma catiónico modificado con PEG al que se ha unido ARNhc se usa en combinación con un agente quimioterapéutico que tiene acción inhibidora de TS (por ejemplo, un agente antitumoral de 5-FU o un hidrato sódico de pemetrexed), puede aumentarse la sensibilidad de las células cancerosas al agente quimioterapéutico, potenciándose de esta manera los efectos antitumorales. La presente invención se ha realizado basándose en los
60 descubrimientos anteriores.

Específicamente, la presente invención se describe a continuación.

65 [1] Un agente antitumoral, que comprende ARN de horquilla corta (ARNhc) capaz de inhibir la expresión de la timidilato sintasa por la acción de ARNi y un liposoma catiónico modificado con PEG, en el que el ARNhc está unido a la superficie del liposoma catiónico modificado con PEG y tiene un saliente que comprende al menos dos

nucleótidos en el extremo 3'.

[2] El agente antitumoral de acuerdo con [1], en el que el ARNhc comprende una cadena codificante que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una cadena antisentido que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena codificante.

[3] El agente antitumoral de acuerdo con [1] o [2], en el que el ARNhc comprende una cadena codificante que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una cadena antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

[4] El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de [1] a [3], en el que el ARNhc consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

[5] El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de [1] a [4], en el que el liposoma catiónico modificado con PEG comprende un liposoma catiónico compuesto de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilglicerofosfolina (POPC), colesterol (CHOL) y cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dielanolamina (DC-6-14).

[6] El agente antitumoral de acuerdo con [5], que contiene DOPE, POPC, CHOL y DC-6-14 a una relación molar de 3:2:3:2.

[7] El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de [1] a [6], en el que el tamaño de partícula del agente antitumoral es de 200 a 300 nm.

[8] El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de [1] a [7], en el que, además, a la superficie del liposoma catiónico modificado con PEG está unido un ARNip o ARNhc capaz de inhibir la expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes implicados en la proliferación de células tumorales.

[9] El agente antitumoral de acuerdo con [8], en el que el gen implicado en la proliferación de células tumorales es al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican VEGF, EGFR, PDGF, HGF, Wint, Bcl-2, survivina, ribonucleótido reductasa y ADN polimerasa.

[10] El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de [1] a [9], que se usa en combinación con un agente quimiostático para el tratamiento de tumores.

[11] Un producto combinado, que contiene el agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de [1] a [10] y un agente quimioterapéutico para el tratamiento de tumores.

[12] El agente antitumoral de acuerdo con [10] o el producto combinado de acuerdo con [11], en el que el agente quimioterapéutico para el tratamiento de tumores es un agente antitumoral que tiene acción inhibidora de TS.

[13] El agente antitumoral o el producto combinado de acuerdo con [12], en el que el agente antitumoral que tiene acción inhibidora de TS es un agente antitumoral de 5-FU o un hidrato sódico de pemetrexed.

[14] El agente antitumoral o el producto combinado de acuerdo con [13], en el que el agente antitumoral de 5-FU es un fármaco compuesto de tegafur, gimeracil y oteracil potasio.

Esta descripción incluye parte o todo el contenido desvelado en la descripción y/o dibujos de la solicitud de patente japonesa n.º 2011-114946, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

El agente antitumoral que comprende, como principio activo, Un liposoma que contiene una molécula de ARNhc que se dirige a una timidilato sintasa de la presente invención puede inhibir el crecimiento de tumores que expresan TS mediante la administración *in vivo*.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una imagen característica que indica los efectos inhibidores de la expresión de TS de ARNip y ARNhc que se dirigen a TS para líneas celulares de cáncer colorrectal humano (DLD-1(A) y DLD-1/FU(B)). Cada calle muestra los resultados para las siguientes muestras tratadas con ARNip o ARNhc: 1: Sin tratar; 2: siCont 10 nM; 3: siTS 1 nM; 4: siTS 5 nM; 5: siTS 10 nM; 6: shTS 1 nM; 7: shTS 5 nM; y 8: shTS 10 nM.

Cada una de las figuras 2(A) y 2(B) muestra un diagrama característico que indica los efectos inhibidores de la expresión de TS sobre el crecimiento celular para (A): ARNip que se dirige a TS; y (B): ARNhc que se dirige a TS confirmada en una línea celular de cáncer colorrectal humano (DLD-1) en presencia o ausencia de 5-FU. La figura 2 (C) muestra la tasa inhibidora del crecimiento celular (%) para cada muestra, 96 horas después de la adición de medio nuevo.

Cada una de las figuras 3(A) y 3(B) muestra un diagrama característico que indica los efectos inhibidores de la expresión de TS sobre el crecimiento celular para (A): ARNip que se dirige a TS; y (B): ARNhc que se dirige a TS confirmada en una línea celular de cáncer colorrectal humano (DLD-1/FU) en presencia o ausencia de 5-FU. La figura 3 (C) muestra la tasa inhibidora del crecimiento celular (%) para cada muestra, 96 horas después de la adición de medio nuevo.

Cada una de las figuras 4(A) y 4(B) muestra un diagrama característico que indica los resultados confirmados para ARNhc que se dirige a TS, en presencia o ausencia de TS-1, en ratones portadores de una línea celular de cáncer colorrectal humano (DLD-1) ((A): efectos inhibidores del crecimiento tumoral; y (B): aumento o disminución de peso).

La figura 5 muestra una fotografía que indica los efectos inhibidores del crecimiento tumoral confirmados para ARNhc que se dirige a TS, en presencia o ausencia de TS-1, en ratones portadores de una línea celular de cáncer colorrectal humano (DLD-1): 1: Control (administración de sacarosa); 2: S-1; 3: TS-ARNhc/liposoma; y 4: S-1 + TS-ARNhc/liposoma.

Cada una de las figuras 6 (A) y 6 (B) muestra un cambio dependiente del tiempo de la tasa inhibidora del

crecimiento celular (%) proporcionada por hidrato sódico de pemetrexed, ARNhc que se dirige a TS, o una combinación de hidrato sódico de pemetrexed y ARNhc que se dirige a TS en la línea celular de mesotelioma pleural maligno humano METO 211 H.

5 La figura 7 muestra un diagrama característico que indica los efectos inhibidores del crecimiento tumoral confirmados para ARNhc que se dirige a TS, en presencia o ausencia de hidrato sódico de pemetrexed, en ratones portadores de una línea celular de mesotelioma pleural maligno humano METO 211 H.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10 El ARN de horquilla corta (denominado en lo sucesivo "ARNhc") capaz de inhibir la expresión de la timidilato sintasa (en lo sucesivo denominada "TS") de la presente invención presenta acción de ARNi específica de TS cuando se dirige a una porción de ARNm de la timidilato sintasa. En consecuencia, el ARN de horquilla corta puede inhibir significativamente la expresión de TS. En este caso, cuando la molécula de ARNi de la presente invención "se dirige a una porción de ARNm", esto significa que la cadena antisentido de ARNhc descrita con detalle más adelante
15 puede hibridar con una porción de ARNm diana en condiciones rigurosas.

Las condiciones rigurosas pueden determinarse basándose en la temperatura de fusión (Tm) para ácidos nucleicos a la que se forma un híbrido de acuerdo con un método convencional. Por ejemplo, las condiciones de lavado que permiten el mantenimiento de la hibridación comprenden, por ejemplo, generalmente "SSC 1x, SDS al 0,1 %, 37°C"
20 más estrictamente "SSC 0,5x, SDS al 0,1 %, 42°C" y, aún más estrictamente, "SSC 0,1x, SDS al 0,1 %, 65°C".

El ARNhc de la presente invención comprende una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótidos de ORF que codifica TS o una secuencia de nucleótidos parcialmente idéntica a la misma y una cadena antisentido que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena codificante. En este caso, la expresión "una secuencia de
25 nucleótidos del ORF parcialmente idéntica a la misma" significa una secuencia de nucleótidos obtenida por sustitución de timina con uracilo en la secuencia de nucleótidos del ORF o una secuencia de nucleótidos parcialmente idéntica a la misma.

La cadena codificante consiste en 15 a 25 nucleótidos y, preferentemente, en 19 nucleótidos. La secuencia de
30 nucleótidos de la cadena codificante deseablemente es idéntica a la secuencia de nucleótidos del ORF que codifica TS. Sin embargo, puede ser una secuencia sustancialmente idéntica (es decir, homóloga). Específicamente, la secuencia de nucleótidos de una cadena codificante puede comprender la secuencia de nucleótidos del ORF que incluyen una sustitución, una delección, una inserción y/o una adición de 1 o una pluralidad de (es decir, 1 a 3)
35 nucleótidos, preferentemente 1 a 2 nucleótidos y, más preferentemente, 1 nucleótido.

La cadena antisentido tiene una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la cadena codificante en condiciones rigurosas. La cadena antisentido puede comprender un desemparejamiento, incluyendo una sustitución, una delección, una inserción y/o una adición de 1 a 3 nucleótidos, preferentemente 1 o 2 nucleótidos y, más preferentemente, 1 nucleótido, siempre que pueda hibridar en condiciones rigurosas. Preferentemente, la cadena
40 antisentido consiste en una secuencia de nucleótidos perfectamente complementaria a la cadena codificante.

Las secuencias de nucleótidos de una cadena codificante y una cadena antisentido pueden seleccionarse basándose en una secuencia de nucleótidos conocida que codifica TS (GenBank: CR601528.1). Existe diversos métodos conocidos para seleccionar dichas secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, puede usarse un sistema de
45 soporte de diseño de ARNip (Takara Bio Inc.).

Los ejemplos de una cadena codificante usada en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, una cadena codificante que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias de nucleótidos: 5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3' (SEQ ID NO: 1); 5'-GAAUACAGAGAUUGGAAU-3' (SEQ ID NO: 3); 5'-CGAUCGAUGAUGAUGAGUGU-3' (SEQ ID NO: 5); y 5'-GGGUGUUUUGGAGGAGUUGTT-3' (SEQ ID NO: 11).
50

Preferentemente, el ARNhc de la presente invención comprende: una cadena codificante (5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3'; SEQ ID NO: 1) y una cadena antisentido (5'-UCAUGAUCGAUGGUGUUAC-3'; SEQ ID NO: 2); una cadena codificante (5'-GAAUACAGAGAUUGGAAU-3'; SEQ ID NO: 3) y una cadena antisentido (5'-AUUCCAUAUCUCUGUAUUC; SEQ ID NO: 4); una cadena codificante (5'-CGAUCGAUGAUGAUGAGUGU-3'; SEQ ID NO: 5) y una cadena antisentido (5'-ACACUCUACAUCAUGAUCG-3'; SEQ ID NO: 6); o una cadena codificante (5'-GGGUGUUUUGGAGGAGUUGTT-3'; SEQ ID NO: 11) y una cadena antisentido (5'-AACAAUCUCCAAAACACCC-3'; SEQ ID NO: 12).
55

Además, preferentemente, el ARNhc de la presente invención comprende una cadena codificante que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una cadena antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.
60

La cadena codificante y la cadena antisentido se unen a través de una porción enlazadora. La porción enlazadora forma un bucle de tal forma que la cadena resultante se pliega. En consecuencia, la cadena antisentido y la cadena codificante hibridan entre sí, dando como resultado la formación de una cadena doble. Dicha porción enlazadora
65

contenida en una molécula de ARNhc no está limitada particularmente y, por lo tanto, puede ser un enlazador polinucleotídico o un enlazador no polinucleotídico siempre que enlace una cadena codificante y una cadena antisentido para formar una estructura en tallo-bucle. Preferentemente, el enlazador polinucleotídico es el que se conoce en la técnica que consiste en 2 a 22 nucleótidos. Los ejemplos específicos del mismo incluyen

5 UAGUGCUCUGGUUG (SEQ ID NO: 7), UUCAAGAGA, CCACC, CUCGAG, CCACACC, UUCAAGAGA, AUG, CCC y UUCG. De estos, es preferible UAGUGCUCUGGUUG (SEQ ID NO: 7).

El ARNhc de la presente invención tiene un saliente que comprende al menos 2 nucleótidos en el extremo 3'.

10 De acuerdo con la presente invención, el término "saliente" se refiere a un nucleótido añadido en el extremo 3' de una cadena antisentido que no tiene un nucleótido capaz de unirse de manera complementaria a la posición correspondiente en la cadena codificante. Si la cadena antisentido no tiene un saliente en el extremo 3', el grado de inhibición de la expresión de TS causada por el ARNhc se reduce aproximadamente de un 40 % a un 60 % tras la transfección con el uso de un liposoma catiónico modificado con PEG descrito con detalle más adelante, en

15 comparación con un caso en el que la cadena antisentido tiene un saliente en el extremo 3'. Los tipos o números de nucleótidos del saliente no están limitados. Por ejemplo, dicho saliente consiste en una secuencia que comprende de 1 a 5 nucleótidos, preferentemente de 1 a 3 nucleótidos y, más preferentemente, 1 o 2 nucleótidos. Los ejemplos de la secuencia incluyen TTT, UU y TT. Preferentemente, se usa UU.

20 De acuerdo con la presente invención, un ejemplo preferible de ARNhc es un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

Además, la cadena codificante o la cadena antisentido pueden estar fosforiladas en el extremo 5' si es necesario. Se puede unir ácido trifosfórico (ppp) al extremo 5'.

25 En el caso del liposoma catiónico modificado con PEG de la presente invención, una o una pluralidad de moléculas de polietilenglicol (PEG) están unidas covalentemente a la superficie del liposoma catiónico, permitiendo que el liposoma catiónico tenga mayor capacidad de circular *in vivo*.

30 El liposoma catiónico puede producirse por un método conocido, tal como un método de agitación de película fina (el método de Bangham) (A. D. Bangham et al., J. Mol. Biol., 13, 238-252 (1965); A. D. Bangham y R. W. Horne, J. Mol. Biol., 8, 660-668 (1964)). Específicamente, al menos un tipo de fosfolípido se disuelve en un disolvente orgánico, tal como cloroformo, en un recipiente tal como un matraz. El disolvente orgánico se evapora para formar una membrana lipídica en el fondo del recipiente. Se introduce una solución acuosa, tal como un tampón, en el mismo, seguido de

35 agitación. De esta manera, puede obtenerse una suspensión que contiene liposomas.

El liposoma catiónico de la presente invención tiene membranas uni- o multilamelares que consisten en, al menos, un fosfolípido seleccionado entre el grupo que consiste en dioleoilfosfatidiletanolamina (denominado en lo sucesivo "DOPE"), palmitoiloleoilglicerofosfolina (denominado en lo sucesivo "POPC"), colesterol (denominado en lo sucesivo "CHOL"), cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina (denominado en lo sucesivo "DC-6-14"), fosfatidilcolina de yema de huevo purificada e hidrogenada, fosfatidilcolina de soja purificada e hidrogenada, dipalmitoil fosfatidilcolina, diestearoil fosfatidilcolina y 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina.

45 Preferentemente, el liposoma catiónico de la presente invención consiste en DOPE, POPC, CHOL y DC-6-14. La relación de contenido (relación molar) de DOPE, POPC, CHOL y DC-6-14 en el liposoma catiónico es DOPE: POPC: CHOL: DC-6-14 = 2 a 4 : 4 a 1 : 3 a 1 : 1 a 4 y, preferentemente, 3 : 2 : 3 : 2.

La molécula de PEG unida a la superficie del liposoma catiónico se selecciona entre moléculas de PEG que tienen pesos moleculares de 500 a 5000 y, preferentemente, de aproximadamente 2000. La unión de PEG a un liposoma catiónico puede realizarse por un método conocido que no está limitado de forma particular. Sin embargo, puede usarse un método de inserción posterior o similar. Específicamente, después de la formación del liposoma catiónico, un fosfolípido PEGilado se incuba con el liposoma catiónico en condiciones apropiadas (por ejemplo, de 30°C a 60°C durante 30 minutos a 3 horas). De esta manera, la porción de lípido del fosfolípido PEGilado puede incorporarse en la membrana de fosfolípidos externa del liposoma catiónico de tal manera que el PEG quede

50 expuesto en la superficie del liposoma catiónico. En ese momento, la cantidad del fosfolípido PEGilado usado para la incorporación representa de un 3 % a un 10 % y, preferentemente, un 5 % (porcentaje molar) de la cantidad total de lípidos del liposoma catiónico. Los ejemplos del fosfolípido PEGilado que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, mPEG₂₀₀₀-DSPE.

60 El liposoma catiónico modificado con PEG de la presente invención tiene un tamaño de partícula de 80 a 200 nm y, preferentemente, de aproximadamente 100 nm. El liposoma catiónico modificado con PEG de la presente invención tiene un potencial zeta de 10 a 40 mV y, preferentemente, de aproximadamente 25 mV.

65 El ARNhc anterior se une de forma covalente o no covalente a la superficie de la membrana del liposoma catiónico modificado con PEG. Para unir el ARNhc al liposoma catiónico modificado con PEG, es deseable agitar intensamente una mezcla líquida que contenga el ARNhc y el liposoma catiónico modificado con PEG durante

aproximadamente 1 a 15 minutos y, preferentemente, durante 10 minutos. La agitación permite el ajuste del tamaño de partícula del liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc que puede obtenerse a varios cientos de nanómetros (Barichello, J. M., et al., Int. J. Pharm. 410, 153-160 (2011)). Además, la agitación permite la dispersión uniforme del ARNhc en la superficie del liposoma catiónico modificado con PEG en el momento de la unión. Por lo tanto, es posible evitar la distribución irregular en los tejidos del liposoma catiónico modificado con PEG debida a la falta de uniformidad en la unión del ARNhc sobre el liposoma.

De acuerdo con la presente invención, El liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc tiene un tamaño de partícula de 120 a 600 nm y, preferentemente, de 200 a 300 nm. Además, el liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc tiene un potencial zeta de 5 a 30 mV y, preferentemente, de aproximadamente 10 a 25 mV de acuerdo con la presente invención. La carga en la superficie del liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc es aproximadamente neutra. Además, es poco probable que el liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc se una a una proteína sérica debido al impedimento estérico inducido por el PEG. Por lo tanto, puede evitarse que el liposoma quede atrapado en los alvéolos pulmonares, lo cual permite que el liposoma catiónico tenga mayor capacidad de circular *in vivo*.

El liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc de la presente invención puede contener otro ARNhc o ARNi que se dirija a un gen diferente expresado en células tumorales, además del ARNhc anterior. Los ejemplos de "un gen diferente expresado en células tumorales" incluyen, aunque sin limitación, genes que codifican factores implicados en la proliferación de células tumorales, por ejemplo, el grupo de factores reguladores del crecimiento (que consiste en VEGF, EGFR, PDGF, HGF, Wnt, Bcl-2, survivina y similares) y el grupo de enzimas relacionadas con la síntesis de nucleótidos (que consiste en ribonucleótido reductasa, ADN polimerasa y similares). El ARNhc y el ARNip o el ARNhc que se dirige a un gen diferente expresado en células tumorales pueden unirse al mismo liposoma catiónico modificado con PEG o pueden unirse por separado a diferentes liposomas catiónicos modificados con PEG.

En este caso, el liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc algunas veces se denomina "lipoplejo modificado con PEG."

Tal como se describe con detalle en los ejemplos más adelante, es posible que el liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc inhiba la proliferación celular como resultado de la administración *in vivo*. Por lo tanto, puede usarse como agente antitumoral para tratar cánceres.

Con el agente antitumoral de la presente invención pueden tratarse cánceres que presentan altos niveles de expresión de TS. Los ejemplos de estos cánceres incluyen, pero no se limitan particularmente a, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de las vías biliares, cáncer de vesícula biliar y conducto biliar, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello del útero, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, tumor testicular, sarcomas osteogénicos y de tejidos blandos, leucemia, linfoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de piel, tumor cerebral y mesotelioma pleural maligno. Son ejemplos preferibles cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de las vías biliares, cáncer de hígado y mesotelioma pleural maligno. De estos, son particularmente preferibles el cáncer colorrectal y el mesotelioma pleural maligno.

El agente antitumoral de la presente invención puede contener aditivos que puedan usarse para la producción de medicinas, además del liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc. Los ejemplos de dichos aditivos incluyen excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, diluyentes, solubilizantes, agentes de suspensión, agentes de isotonicidad, modificadores del pH, tampones, estabilizantes, colorantes, agentes saborizantes, correctivos e histidina.

Los ejemplos de excipientes incluyen lactosa, sacarosa, cloruro sódico, glucosa, maltosa, manitol, eritritol, xilitol, maltitol, inositol, dextrano, sorbitol, albúmina, urea, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa cristalina, sílice, metilcelulosa, glicerina, alginato de sodio, goma arábica y una mezcla de cualquiera de los mismos. Los ejemplos de lubricantes incluyen talco purificado, estearato, borato sódico, polietilenglicol y una mezcla de cualquiera de los mismos. Los ejemplos de aglutinantes incluyen jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, alcohol polivinílico, éter polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, goma laca, metilcelulosa, etilcelulosa, agua, etanol, fosfato potásico y una mezcla de cualquiera de los mismos. Los ejemplos de disgregantes incluyen almidón deshidratado, alginato de sodio, agar en polvo, laminarina en polvo, bicarbonato sódico, carbonato cálcico, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano, laurilsulfato de sodio, monoglicérido de ácido esteárico, almidón, lactosa y una mezcla de cualquiera de los mismos. Los ejemplos de diluyentes incluyen agua, alcohol etílico, macrogol, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxilado, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano y una mezcla de cualquiera de los mismos. Los ejemplos de estabilizantes incluyen piro-sulfito sódico, ácido etilendiaminotetraacético, ácido tioglicólico, ácido tioláctico y una mezcla de cualquiera de los mismos. Los ejemplos de isotonicidad incluyen cloruro de sodio, ácido bórico, glucosa, glicerina y una mezcla de cualquiera de los mismos. Los ejemplos de modificadores del pH y tampones incluyen citrato sódico, ácido cítrico, acetato de sodio, fosfato sódico y una mezcla de cualquiera de los mismos.

El agente antitumoral de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración intraarterial, administración tópica por inyección, administración intraperitoneal o intratorácica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración sublingual, absorción percutánea o administración intrarrectal). Preferentemente, el agente antitumoral de la presente invención
5 puede administrarse por administración intravenosa, administración intraperitoneal o administración intratorácica.

El agente antitumoral de la presente invención puede prepararse en una forma de dosificación adecuada de acuerdo con la vía de administración. Específicamente, el agente antitumoral puede prepararse en diversas formas de dosificación, tales como preparaciones para inyección, suspensiones, emulsionantes, pomadas, cremas,
10 comprimidos, cápsulas, preparaciones granuladas, preparaciones en polvo, píldoras, gránulos finos, trociscos, preparaciones de fármaco para administración intrarrectal, supositorios oleaginosos o supositorios solubles en agua.

Los efectos del agente antitumoral de la presente invención pueden evaluarse administrando el agente antitumoral a células o tejidos del cáncer mencionado anteriormente o a individuos que han contraído el cáncer, comparando los
15 tamaños de los tumores con los tamaños de los tumores celulares o tisulares del cáncer mencionado anteriormente o de individuos que han contraído el cáncer a los que no se les ha administrado el agente antitumoral (o antes de la administración) y confirmando si puede observarse o no reducción o desaparición del tumor. Las células cancerosas usadas para la evaluación de los efectos del agente antitumoral de la presente invención no están limitadas a un tipo particular de células cancerosas, siempre que se exprese TS en las células. Los ejemplos de células cancerosas
20 usadas para la evaluación de los efectos del agente antitumoral de la presente invención incluyen: líneas celulares de cáncer colorrectal humano tales como DLD-1, DLD-1/5FU (una línea celular DLD-1 resistente a 5-FU), KM12C/5FU (una línea celular KM12C resistente a 5-FU) y HT29/5FU (una línea celular HT29 resistente a 5-FU); y una línea celular de cáncer gástrico humano tal como NUGC-3/5FU (una línea celular NUGC-3 resistente a 5-FU); y una línea celular de mesotelioma humano (METO 211 H).

El agente antitumoral de la presente invención es capaz de ejercer efectos antitumorales que son dos, tres, cuatro, cinco, diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, cien o más veces mayores que los de un agente antitumoral que comprende una molécula de ARNi que se dirige al ARNm de TS como principio activo, que es conocido en la
25 técnica.

Para la liberación *in vivo* de ARNhc en células diana, convencionalmente se ha usado un vector viral que contiene ADN que codifica ARNhc (documento WO2010/113844). El ADN que codifica ARNhc se transfiere al interior de las células haciendo uso de presión de agua tras la inyección del vector viral o la infección viral, obteniéndose como
30 resultado la expresión intranuclear de ARNhc. Como ocurre en el caso del ARNhc endógeno, el ARNhc expresado entra en contacto con una enzima denominada "dicer" de tal forma que se escinde del mismo la construcción de tallo-bucle. De esta manera, se forma un ARNip que consiste en un ARN bicatenario (que consiste en cadenas complementarias entre sí) de tal manera que se presenta la acción del ARNi. Sin embargo, como resultado de la administración oral o parenteral del agente antitumoral de la presente invención, en las células tumorales se libera ARNhc complejo con un liposoma catiónico modificado con PEG en el agente. El ARNhc liberado en las células
40 tumorales se transfiere al interior de las células por endocitosis. Específicamente, a diferencia de la técnica convencional anterior, el ARNhc de la presente invención no es ARNhc expresado en las células diana. Los presentes inventores observaron por primera vez que el ARNhc exógeno introducido extracelularmente *in vivo* puede presentar acción de ARNi sin degradarse y, por lo tanto, puede inhibir la expresión de un gen endógeno expresado en células diana.

Además, si el ARNip está acoplado a un liposoma catiónico modificado con PEG, sería probable que una cadena codificante o cadena antisentido sola de ARNip que no forma una doble cadena (consistente en cadenas complementarias entre sí) se uniera al liposoma catiónico modificado con PEG durante el proceso de fabricación. Dicho liposoma catiónico modificado con PEG que contiene solo una cadena codificante o cadena antisentido de
50 ARNip puede considerarse una impureza y, por lo tanto, dicho liposoma es un producto farmacológico indeseable. Sin embargo, en el caso del liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc, es poco probable que se forme dicha impureza y, por lo tanto, el liposoma puede ser un producto farmacológico deseable.

El agente antitumoral de la presente invención puede usarse con un agente quimioterapéutico existente. Los ejemplos de un agente quimioterapéutico existente incluyen un agente antitumoral que tiene acción inhibidora de TS.

Dicho "agente antitumoral que tiene acción inhibidora de TS" no está limitado particularmente siempre que pueda inhibir la función de TS. Los ejemplos del mismo incluyen agentes antitumorales de 5-FU, hidrato sódico de pemetrexed, raltitrexed (Tomudex), metotrexato (MTX) y OSI-7904L (OSI).

Se ha informado sobre la relación entre el nivel de expresión de TS y la sensibilidad de un agente antitumoral de 5-FU (Patrick G. Johnston et al., Cancer Res 1995; 55: 1407-12 y Kun-Huei Yeh et al., Cancer 1998; 82: 1626-31). Entre los pacientes con cáncer, los agentes antitumorales de 5-FU son sorprendentemente eficaces para pacientes con cáncer con niveles de expresión relativamente bajos de TS, mientras que, por otro lado, los pacientes con
65 cáncer con niveles de expresión relativamente altos de TS presentan resistencia a los agentes antitumorales de 5-FU. La administración del agente antitumoral de la presente invención posibilita la supresión de la producción de TS

en el tejido tumoral, permitiendo un aumento de la sensibilidad a un agente tumoral de 5-FU en dicho tejido tumoral. Además, el liposoma catiónico modificado con PEG se acumula selectivamente en tumores cuando se usa en combinación con un agente antitumoral de 5-FU (Yusuke Doi et al., Cancer Sci, noviembre de 2010, vol. 101, n.º 11, 2470-2475).

5 Cuando el agente antitumoral de la presente invención que contiene el liposoma catiónico modificado con PEG se usa en combinación con un agente antitumoral de 5-FU, el agente tiene los efectos anteriores y, por lo tanto, el ARNhc puede liberarse en tumores con una buena eficacia. El agente antitumoral de la presente invención es capaz de ejercer efectos antitumorales que son dos, tres, cuatro, cinco o más veces mayores que los de un agente antitumoral de 5-FU o el agente antitumoral de la presente invención usado solo.

15 Los ejemplos de agentes antitumorales de 5-FU incluyen 5-FU y un derivado de 5-FU a partir del cual se produce 5-FU como metabolito activo. Un ejemplo de un derivado de 5-FU es un agente que contiene tegafur. Un derivado de 5-FU preferentemente es un fármaco compuesto que contiene tegafur. Los ejemplos específicos del mismo incluyen un fármaco compuesto de tegafur y uracilo (por ejemplo, UFT (marca comercial registrada) (Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.)), un fármaco compuesto de tegafur, gimeracil y oteracil potasio. Se prefiere particularmente el fármaco compuesto de tegafur, gimeracil y oteracil potasio (por ejemplo, TS-1 (marca comercial registrada), Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.) descrito más adelante. Además, el agente antitumoral de 5-FU se denomina en el presente documento "S-1," o "TS-1." Sin embargo, dichos términos pueden usarse de forma indistinta.

20 Además, un ejemplo de hidrato sódico de pemetrexed es Alimta (marca comercial registrada) (Eli Lilly Japan K.K.). Además, como ocurre en el caso del agente antitumoral de 5-FU, cuando se usan en combinación hidrato sódico de pemetrexed y el agente antitumoral de la presente invención, puede liberarse ARNhc eficazmente en los tumores. Además, un uso combinado de hidrato sódico de pemetrexed y el agente antitumoral de la presente invención da como resultado efectos antitumorales extraordinariamente significativos que son dos, tres, cuatro, cinco o más veces mayores que los del hidrato sódico de pemetrexed o el agente antitumoral de la presente invención usados individualmente.

30 El agente antitumoral de la presente invención puede usarse en combinación con un agente quimioterapéutico diferente existente además de o en lugar del agente antitumoral que tiene acción inhibidora de TS. Los ejemplos de dicho agente quimioterapéutico incluyen ciclofosfamida, N-óxido de mostaza nitrogenada, ifosfamida, melfalán, busulfán, mitobronitol, carboquona, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolomida, carmustina, pemetrexed disódico, metotrexato, ribósido de 6-mercaptopurina, mercaptopurina, doxifluridina, carmofur, citarabina, ocfosfato de citarabina, encitabina, gemcitabina, fludarabina, pemetrexed, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, paclitaxel, docetaxel, clorhidrato de irinotecán y capecitabina. Puede usarse uno o una pluralidad de agentes quimioterapéuticos seleccionados entre los ejemplos. Además, como ocurre en el caso del agente antitumoral que tiene acción inhibidora de TS, cuando se usan en combinación el agente quimioterapéutico anterior y el agente antitumoral de la presente invención, puede liberarse ARNhc eficazmente en los tumores. Además, el uso combinado del agente quimioterapéutico y el agente antitumoral de la presente invención da como resultado efectos antitumorales extraordinariamente significativos que son dos, tres, cuatro, cinco o más veces mayores que los del agente quimioterapéutico o el agente antitumoral de la presente invención usados individualmente.

45 Puede proporcionarse un producto combinado del agente antitumoral de la presente invención y un agente quimioterapéutico existente siempre que el agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico existente se administren en combinación.

50 Dicho "producto combinado" puede ser un fármaco compuesto que contiene el agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico existente como principios activos. Además, puede producirse/empaquetarse/distribuirse un solo envase (un kit de formulación) que contiene el agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico existente apropiado para la administración combinada.

55 La expresión "administración combinada" puede referirse no solo a la administración simultánea del agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico existente, sino también a la administración del agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico existente a ciertos intervalos.

60 La dosis de administración y la frecuencia de administración del agente antitumoral de la presente invención pueden variar dependiendo de factores tales como la edad y el peso del paciente y la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, el agente antitumoral de la presente invención puede administrarse a una sola dosis apropiadamente dentro del intervalo de 0,0001 mg a 100 mg de ARNhc por kg de peso corporal, de 1 a 3 veces al día o cada 1 a 21 días. El liposoma catiónico modificado con PEG que contiene ARNhc contenido en el agente antitumoral de la presente invención tiene mayor capacidad de circular *in vivo* que un complejo conocido convencionalmente (lipoplejo) que comprende una molécula de ARNi y un liposoma. Por lo tanto, es posible evitar la administración frecuente. Dicha administración permite evitar la detección de cuerpos extraños *in vivo* por el sistema inmunitario.

65 La dosis de administración y la frecuencia de administración del agente quimioterapéutico existente pueden variar dependiendo de factores tales como los tipos de sustancias químicas contenidas como principios activos, la edad y

el peso del paciente, y la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, el agente quimioterapéutico existente puede administrarse a una sola dosis apropiadamente dentro del intervalo de 0,0001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal, de 1 a 3 veces al día o cada 1 a 14 días. Por ejemplo, si el agente quimioterapéutico existente es un agente antitumoral de 5-FU, puede administrarse a una dosis diaria de 60 a 160 mg de tegafur todos los días o cada 1 a 7 días. El agente quimioterapéutico existente puede administrarse a dosis y frecuencias menores cuando se usa en combinación con el agente antitumoral de la presente invención en comparación con cuando se administra solo. Esto puede evitar o retrasar el desarrollo de efectos secundarios que pueden producirse por la administración de los agentes quimioterapéuticos existentes. Los ejemplos de efectos secundarios incluyen, aunque sin limitación, supresión de médula ósea, anemia hemolítica, síndrome de coagulación intravascular diseminada, insuficiencia hepática fulminante, deshidratación, enteritis, neumonía intersticial, estomatitis, úlcera del tracto gastrointestinal, hemorragia del tracto gastrointestinal, perforación del tracto gastrointestinal, insuficiencia renal aguda, síndrome mucocutáneo ocular, necrólisis epidérmica tóxica, trastorno psiconeurótico, pancreatitis aguda, rabdomiolisis y anosmia.

La presente divulgación también se refiere a un método para tratar cánceres usando el agente antitumoral de la presente invención. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse por el método incluyen los cánceres definidos anteriormente. Además, según el método, las vías de administración y las dosificaciones del agente antitumoral de la presente invención y los agentes quimioterapéuticos existentes son los que se han descrito anteriormente.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe con más detalle con referencia a los ejemplos proporcionados a continuación. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1: preparación de molécula de ARNi

Se sintetizaron los ARNip y ARNhc descritos más adelante por un método conocido convencionalmente.

(I) ARNip que se dirige a TS

El ARNip que se dirige a TS usado en el presente documento se sintetiza como el ARNip que se dirige a TS que, según se ha confirmado, tiene los efectos antitumorales (documento WO2010/113844). Comprende la cadena codificante y la cadena antisentido mostradas a continuación.

Cadena codificante:

5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3' (SEQ ID NO: 1)

Cadena antisentido:

5'-UCAUGAUCGAUGGUGUUAC-3' (SEQ ID NO: 2)

Además, El ARNip que se dirige a TS se denomina en lo sucesivo "siTS".

(II) ARNip que se dirige a luciferasa

El ARNip que se dirige a luciferasa se sintetizó como ARNip de control. El ARNip comprende la cadena codificante y la cadena antisentido mostradas a continuación.

Cadena codificante:

5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT-3' (SEQ ID NO: 9)

Cadena antisentido:

5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGTT-3' (SEQ ID NO: 10)

Además, el ARNip que se dirige a luciferasa se denomina en lo sucesivo "siCont."

(III) ARNhc que se dirige a TS

El ARNhc que se dirige a TS usado en el presente documento se sintetiza como el ARNhc que se dirige a TS que,

según se ha confirmado, tiene los efectos antitumorales (documento WO2010/113844). Comprende la siguiente secuencia.

TS-ARNhc:

5

5'-GUAACACCAUCGAUCAUGAUAGUGCUCUGGUUGUCAUGAUCGAUG
GUGUUACUU-3' (SEQ ID NO: 8)

Este ARNhc difiere del ARNhc convencional mencionado anteriormente que se dirige a TS en que tiene los dos uracilos en el extremo 3' (que constituyen un saliente). Además, el ARNhc que se dirige a TS se denomina en lo sucesivo "shTS".

10

Ejemplo 2: inhibición de la expresión de TS inducida por ARNip y ARNhc

Transfección

15

Como reactivo de transfección se usó Lipofectamine™ RNAi MAX (denominado en lo sucesivo "Lf RNAi MAX") que es un liposoma catiónico.

20

Se diluyeron ARNhc o ARNip preparados en el ejemplo 1 y Lf RNAi MAX, por separado, con OptiMEM. Las soluciones resultantes se mezclaron a una relación entre ARNhc o ARNip y Lf RNAi MAX de 100 (pmol) : 5 (µl). En este caso, se usaron cantidades equivalentes de la solución de ARNhc o ARNip y la solución de Lf RNAi MAX. La mezcla líquida obtenida se dejó a temperatura ambiente durante 10 a 20 minutos, formándose como resultado un complejo (lipoplejo).

25

Cada lipoplejo se añadió directamente a una placa de 10 cm que contenía OptiMEM para ajustar el volumen total a 5 ml. A continuación, se sembró una suspensión de células DLD-1 o DLD-1/FU (10 ml) en la placa (500.000 células/placa) obteniéndose un volumen final total de 15 ml y posteriormente se realizó la transfección. En este caso, la concentración final de ARNhc o ARNip se ajustó a 1, 5 o 10 nM. Después de iniciar la transfección, se realizó el cultivo en un medio a 37°C con un 5 % de CO₂ durante 72 horas. Posteriormente, se preparó el extracto celular por el método descrito más adelante.

30

Preparación de extracto celular

35

Setenta y dos (72) horas después de iniciar la transfección, se retiró el medio, seguido de lavado con PBS(-) frío. Las células se separaron de la placa usando una solución de tripsina y el sobrenadante se retiró por centrifugación. Además, se realizó un lavado con PBS(-) frío. A estas células se les añadió tampón de lisis frío (Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NP-40 al 1 %, desoxicolato sódico al 0,25 %, NaCl 150 mM y cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, MO, USA)) (de 100 a 150 µl), seguido de incubación en hielo (4°C) durante 1 hora. De esta manera, las células se lisaron. Posteriormente, se realizó centrifugación (15.000 x g, 15 minutos, 4°C). El sobrenadante obtenido se usó como un extracto celular.

40

Preparación de muestra para SDS-PAGE

45

Se mezclaron cantidades equivalentes del extracto celular anterior y un tampón de muestra 2x y se calentaron usando una placa caliente de microtubos a 95°C durante 3 minutos. Posteriormente, se realizó centrifugación durante 30 segundos, seguido de refrigeración a temperatura ambiente. De esta manera, se obtuvo una muestra para SDS-PAGE.

SDS-PAGE

50

La muestra (6 µl que corresponden a 9 µg de proteína/calle) se aplicó al gel. Este gel se conectó a un suministro de energía (laboratorios Bio-Rad) y se realizó electroforesis durante aproximadamente 80 minutos a una corriente constante de 40 mA para dos láminas de gel (20 mA para una sola lámina de gel).

55

Transferencia de Western

60

Se sumergió papel cortado en trozos con los tamaños adecuados y membrana Hybond-ECL en tampón de transferencia para el pretratamiento. Después de la SDS-PAGE, se usó un aparato de transferencia para transferir proteínas a la membrana Hybond-ECL. La membrana Hybond-ECL sometida a transferencia se sumergió en tampón de bloqueo (leche desnatada al 5 %) para bloquear a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavó 3 veces (5 minutos cada vez) con tampón Tween.

Para la detección de TS y β -actina, se realizó una reacción durante una noche a 4°C usando los siguientes anticuerpos primarios, cada uno diluido con tampón Tween: un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TS humana (1:1000) (ANASPEC, Inc., CA, Estados Unidos); y un anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina humana (1:500) (Bio Vision, Inc., CA, Estados Unidos). Se realizó lavado con tampón Tween 3 veces (durante 5 minutos cada vez).
 5 Posteriormente, la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora usando una solución de anticuerpo secundario (un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP (1:2000) (MP Biomedicals, LLC, Japón)) diluida con tampón Tween. Se realizó lavado con tampón Tween 3 veces (durante 5 minutos cada vez), seguido de una reacción con un reactivo quimioluminiscente de ECL durante aproximadamente 1 minuto. La banda de cada proteína de interés se detectó en una película de rayos X.

10 La Fig. 1 muestra los resultados.

Se reveló que el ARNhc y el ARNip preparados en el ejemplo 1 pueden inhibir significativamente la expresión de TS en células DLD-1 y en células DLD-1/FU. Ejemplo 3: Efectos inhibidores de la proliferación de células cancerosas (células de cáncer colorrectal humano) de ARNip y ARNhc

En este ejemplo, la experimentación se realizó en una escala de placa de 96 pocillos. Se añadió un lipoplejo obtenido como en el caso del ejemplo 2 directamente a los pocillos que contenían OptiMEM para ajustar el volumen total a 50 μ l por pocillo. A continuación, se añadió una suspensión de células DLD-1 o DLD-1/FU (célula de adenocarcinoma intestinal colónico) (2.000 células/100 μ l) a los pocillos a los que se había añadido el lipoplejo (volumen final total: 150 μ l), seguido de transfección. En este caso, la concentración final de ARNhc o ARNip por pocillo era de 5 nM.

Se retiró el medio de cada pocillo 24 horas después del inicio de la transfección. A esto se le añadió medio nuevo que contenía o no un agente quimioterapéutico existente, 5-FU (200 μ l por pocillo). En este caso, se añadió 5-FU a DLD-1 de manera que se obtuvo una concentración de 0,1 μ g/ml. se añadió 5-FU a DLD-1/FU de manera que se obtuvo una concentración de 10 μ g/ml. El medio se retiró 0, 24, 48, 72 o 96 horas después de la adición del medio nuevo. A esto se le añadió una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) al 0,5 % (50 μ l por pocillo), seguido de incubación a 37°C con CO₂ al 5 % durante 4 horas. Además, la solución de MTT al 0,5 % se añadió a los pocillos sin células para obtener una absorbancia de referencia.

Después de finalizar la incubación, se añadió a cada pocillo isopropanol ácido (150 μ l). Los cristales de formazán se disolvieron usando un agitador. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 570 nm usando un lector de placas. Posteriormente, se calculó la tasa de proliferación celular.

$$\text{Tasa de proliferación celular (\%)} = \frac{[A570 \text{ (X horas después de la adición de medio nuevo)}] / A570 \text{ (0 horas después de la adición de medio nuevo)}}{1} \times 100$$

Las Fig. 2 y 3 muestran los resultados.

Como se muestra en las figuras 2 y 3, se observó que siTS y sHTS habían inhibido significativamente la proliferación de células DLD-1 y DLD-1/FU en presencia de 5-FU.

Ejemplo 4: Preparación de liposoma catiónico modificado con PEG

Se preparó liposoma catiónico usando el método de Bangham.

Se disolvieron por separado lípidos catiónicos (es decir, DOPE, POPC, CHOL y DC-6-14) en cloroformo para preparar soluciones madre. Se recogió una muestra de cada solución madre mediante medición precisa con el uso de una jeringa de vidrio, obteniéndose como resultado la siguiente composición de lípidos: DOPE : POPC : CHOL : DC-6-14 = 3:2:3:2 (relación molar). Las muestras se introdujeron en un tubo de ensayo con tapón y se mezclaron en el mismo (la cantidad total de lípidos: 150 mmol). A continuación, se retiró el cloroformo del tubo a presión reducida usando un evaporador rotatorio (IWAKI, Tokyo). Posteriormente, el tubo de ensayo se puso durante una noche en una bomba de vacío para retirar completamente el cloroformo. En consecuencia, en el tubo de ensayo se formó una capa fina de lípidos. A la película fina de lípidos se le añadió una solución de sacarosa al 9 % (30 ml, pH 7,4) como fase acuosa interna, seguido de agitación intensa a 37°C. De esta manera, se hidrolizó completamente la película fina de lípidos de tal manera que se formaron MLV (vesículas multilamelares) (concentración final de lípidos: 50 mM). La solución obtenida se calentó a 37 °C y, durante este periodo de tiempo, se prepararon LUV (vesículas unilamelares grandes) que tenían tamaños de partículas de aproximadamente 100 nm usando membranas de policarbonato de 200, 100 y 50 nm (Nucleopore, CA, Estados Unidos) por un método de extrusión. Los tamaños de partículas y los potenciales zeta de los liposomas se determinaron usando un NICOMP 370 (Particle Sizing System, CA, Estados Unidos) (con un método de dispersión de luz dinámica y un método de dispersión de luz electroforética, respectivamente). Se observó que el tamaño medio de partícula era de 119,9 nm y se observó que el potencial zeta era de 25,56 mV para los liposomas preparados.

Los liposomas se PEGilaron por un método de inserción posterior. Se preparó la solución de liposomas.

Posteriormente, a la solución de liposomas se le añadió una solución de sacarosa al 9 % en la que se había disuelto completamente mPEG₂₀₀₀-DSPE de tal forma que el porcentaje molar de mPEG₂₀₀₀-DSPE representaba un 5 % de la cantidad total de lípidos (DOPE, POPE, CHOL y DC-6-14), seguido de agitación suave en una incubadora que disponía de un agitador a 37°C durante 1 hora.

5

Ejemplo 5: Preparación de lipoplejo modificado con PEG

Se obtuvo un lipoplejo modificado con PEG mezclando la solución de liposoma catiónico modificado con PEG preparada en el ejemplo 4 y shTS preparada en el ejemplo 1 a una relación de liposoma catiónico : shTS = 2000:1 (relación molar), seguido de agitación intensa durante 10 minutos. Se observó que el tamaño medio de partículas y el potencial zeta para el lipoplejo modificado con PEG era de 286,8 nm y 15,81 mV, respectivamente.

10

Ejemplo 6: Efectos antitumorales de lipoplejo modificado con PEG tras la administración sistémica a ratones portadores de cáncer DLD-1

15

Producción de ratones portadores de cáncer DLD-1 En ratones BALB/c nu/nu macho se inoculó por vía subcutánea una suspensión de células DLD-1 (2×10^6 células/100 μ l).

20

El día 8 después de la inoculación de células tumorales, se sometieron a un experimento *in vivo* ratones con volúmenes tumorales de 50-100 mm³.

Evaluación de actividad carcinostática de lipoplejo modificado con PEG

25

El lipoplejo modificado con PEG se administró a través de la vena caudal de ratón a ratones portadores de tumores DLD-1 a una dosis de 80 μ g/300 μ l (refiriéndose a la cantidad de ARNhc) a intervalos de 1 día, 8 veces en total, empezando el día 8 después del trasplante del tumor.

30

Cuando el agente quimioterapéutico existente ("TS-1;" Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.) se usó en combinación con el lipoplejo, el agente se administró por vía oral todos los días durante 15 días a una dosis de 6,9 mg (tegafur)/kg empezando el día 8 después del trasplante del tumor.

La actividad carcinostática se examinó basándose en cambios en el volumen del tumor y el peso corporal.

35

El volumen del tumor se determinó usando la siguiente ecuación.

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = (\text{diámetro largo del tumor}) \times (\text{diámetro corto del tumor})^2 \times 0,5$$

Las Fig. 4 y 5 muestran los resultados.

40

Los grupos tratados con el uso de TS-1 o la preparación de lipoplejo modificado con PEG sola presentaron efectos inhibidores del crecimiento del tumor en una medida aproximadamente un 34 % mayor que el grupo de control. Sin embargo, el grupo tratado con la combinación de TS-1 y la preparación de lipoplejo modificado con PEG presentó efectos inhibidores del crecimiento del tumor en una medida aproximadamente un 66 % mayor que el grupo de control. Para ninguno de los grupos de tratamiento se confirmó toxicidad grave, que puede causar inhibición del aumento de peso y similares. Además, como se muestra en la Figura 5, se confirmó que el crecimiento del tumor puede inhibirse significativamente con el uso combinado de la preparación de lipoplejo modificado con PEG y TS-1.

45

Ejemplo 7: Efectos inhibidores de la proliferación de células cancerosas (células de mesotelioma pleural maligno humano) de ARNhc

50

El experimento se realizó de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 3, excepto por el uso de la línea celular de mesotelioma pleural maligno humano (MSTO 211H) en lugar de la línea celular de carcinoma colorrectal humano (DLD-1 o DLD-1/FU) y el uso de hidrato sódico de pemetrexed (Alimta (marca comercial registrada) (Eli Lilly Japan K.K.)) en lugar de 5-FU como agente quimioterapéutico existente. En la transfección, la concentración final de ARNhc por pocillo fue de 5 o 10 nM. Se añadió hidrato sódico de pemetrexed a un medio nuevo a 10 ng/ml.

55

La tasa de proliferación celular (%) se calculó de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 3. La Fig. 6 muestra los resultados.

60

Como se muestra en la figura 6, shTS inhibía significativamente la proliferación de células MSTO 211H en presencia de hidrato sódico de pemetrexed.

Ejemplo 8: Efectos antitumorales de lipoplejo modificado con PEG tras la administración sistémica a ratones portadores de cáncer MSTO 211H

65

Producción de ratones portadores de cáncer MSTO 211H

En ratones BALB/c nu/nu macho se inoculó por vía subcutánea una suspensión de células MSTO 211H (5×10^6 células/100 μ l). El día 14 después de la inoculación de células tumorales, se sometieron a un experimento *in vivo* ratones con volúmenes tumorales de 50-100 mm³.

5 Evaluación de la actividad carcinostática de lipoplejo modificado con PEG en ratón portador de cáncer MSTO 211H

El lipoplejo modificado con PEG preparado en el ejemplo 5 se administró a través de la vena caudal de ratón a ratones portadores de tumores MSTO 211H a una dosis de 40 μ g/200 μ l (refiriéndose a la cantidad de ARNhc) a intervalos de 1 día, 6 veces en total, empezando el día 14 después del trasplante del tumor.

10 Cuando el agente quimioterapéutico existente, hidrato sódico de pemetrexed (Alimta (marca comercial registrada) (Eli Lilly Japan K.K.)), se usó en combinación con el lipoplejo, el agente se administró por vía intraperitoneal 6 veces en total (día 1, 2, 3, 8, 9 y 10) empezando con 100 mg/kg el día 14 después del trasplante del tumor.

15 La actividad carcinostática se determinó con la tasa de crecimiento del tumor (TGI) (%) el día 21 desde el comienzo de la administración. La TGI (%) se calculó de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 6.

La Fig. 7 muestra el resultado.

20 El grupo tratado con el hidrato sódico de pemetrexed solo o el grupo tratado con la preparación de lipoplejo modificado con PEG que contenía ARNhc que se dirigía a TS (TS ARNhc) solo presentaron efectos inhibidores del crecimiento del tumor en una medida de aproximadamente un 28 % y un 19 %, respectivamente. El grupo tratado con la combinación de hidrato sódico de pemetrexed y la preparación de lipoplejo modificado con PEG que contenía ARNhc no dirigido (NS ARNhc) presentó efectos inhibidores del crecimiento tumoral en una medida de aproximadamente un 22 %. Este efecto inhibidor por la combinación de PMX y NS ARNhc fue muy similar al de PMX solo. Sin embargo, el grupo tratado con la combinación de hidrato sódico de pemetrexed y la preparación de lipoplejo modificado con PEG que contenía ARNhc que se dirigía a TS (TS ARNhc) presentó efectos inhibidores del crecimiento tumoral en una medida de aproximadamente un 42 %.

30 Como se muestra en la figura 7, se confirmó que el crecimiento del tumor puede inhibirse significativamente con el uso combinado de la preparación de lipoplejo modificado con PEG que contiene TS ARNhc e hidrato sódico de pemetrexed.

35 La proliferación del tumor que expresa TS puede inhibirse mediante la administración *in vivo* del agente antitumoral que contiene, como principio activo, un liposoma que contiene una molécula de ARNhc que se dirige a una timidilato sintasa de la presente invención. Además, si el agente antitumoral se usa en combinación con un agente quimioterapéutico, se promueve el direccionamiento al tejido canceroso y, por lo tanto, pueden mejorarse extraordinariamente los efectos antitumorales. Es de esperar que la presente invención contribuya al campo de la terapia del cáncer.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Delta-Fly Pharma, Inc.

45 <120> Un liposoma que comprende una molécula de ARNhc frente a una timidilato sintasa y su del mismo

<130> PH-5014-PCT

50 <150> JP 2011-114946

<151> 23-05-2011

<160> 12

55 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

60

<220>

<223> oligonucleótido sintético

65 <400> 1

guaacaccau cgaucauga 19

<210> 2
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 2
 10 ucaugaucgaugguguuac 19
 <210> 3
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 3
 20 gaauacagag auauggaau 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 4
 30 auuccauauc ucuguauuc 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 5
 40 cgaucaugau guagagugu 19
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 6
 50 acacucuaca ucaugaucg 19
 <210> 7
 <211> 15
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 7
 60 uagugcuccu gguug 15
 65

ES 2 653 923 T3

5
<210> 8
<211> 55
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 8
10 guaacacgau cgaucaugau agugcuccug guugucauga ucgauggugu uacuu 55

<210> 9
<211> 21
<212> ADN / ARN
15 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 9
20 cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 10
<211> 21
25 <212> ADN / ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 10
30 ucgaaguacu cagcguuagt t 21

<210> 11
<211> 21
35 <212> ADN / ARN
<213> Artificial

<220>
40 <223> oligonucleótido sintético

<400> 11
ggguguuuug gaggaguugt t 21

<210> 12
<211> 21
45 <212> ARN
<213> Artificial

<220>
50 <223> oligonucleótido sintético

<400> 12
55 aacaacuccu caaaacacc c 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente antitumoral, que comprende ARN de horquilla corta (ARNhc) capaz de inhibir la expresión de la timidilato sintasa (TS) por la acción de ARNi y un liposoma catiónico modificado con PEG, en donde el ARNhc está unido a la superficie del liposoma catiónico modificado con PEG y tiene un saliente que comprende al menos dos nucleótidos en el extremo 3', en el que el liposoma catiónico modificado con PEG comprende un liposoma catiónico compuesto de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilglicerofosocolina (POPC), colesterol (CHOL) y cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)diétilanolamina (DC-6-14) a una relación molar de 3:2:3:2.
- 10 2. El agente antitumoral de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ARNhc comprende una cadena codificante que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una cadena antisentido que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena codificante.
- 15 3. El agente antitumoral de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el ARNhc comprende una cadena codificante que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una cadena antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.
- 20 4. El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ARNhc consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.
- 25 5. El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tamaño de partícula del agente antitumoral es de 200 a 300 nm.
- 30 6. El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, además, a la superficie del liposoma catiónico modificado con PEG está unido un ARNip o un ARNhc capaces de inhibir la expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes implicados en la proliferación de células tumorales.
- 35 7. El agente antitumoral de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el gen implicado en la proliferación de células tumorales es al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican VEGF, EGFR, PDGF, HGF, Wint, Bcl-2, survivina, ribonucleótido reductasa y ADN polimerasa.
- 40 8. El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es para su uso en un método de tratamiento de tumores.
- 45 9. El agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es para su uso en combinación con un agente quimioterapéutico para el tratamiento de tumores.
- 50 10. Un producto combinado, que contiene el agente antitumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un agente quimioterapéutico para el tratamiento de tumores.
11. El agente antitumoral de acuerdo con la reivindicación 9 o el producto combinado de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el agente quimioterapéutico para el tratamiento de tumores es un agente antitumoral que tiene acción inhibidora de TS.
12. El agente antitumoral o el producto combinado de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el agente antitumoral que tiene acción inhibidora de TS es un agente antitumoral de 5-FU o un hidrato sódico de pemetrexed.
13. El agente antitumoral o el producto combinado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el agente antitumoral de 5-FU es un fármaco compuesto de tegafur, gimeracil y oteracil potasio.

Fig. 1

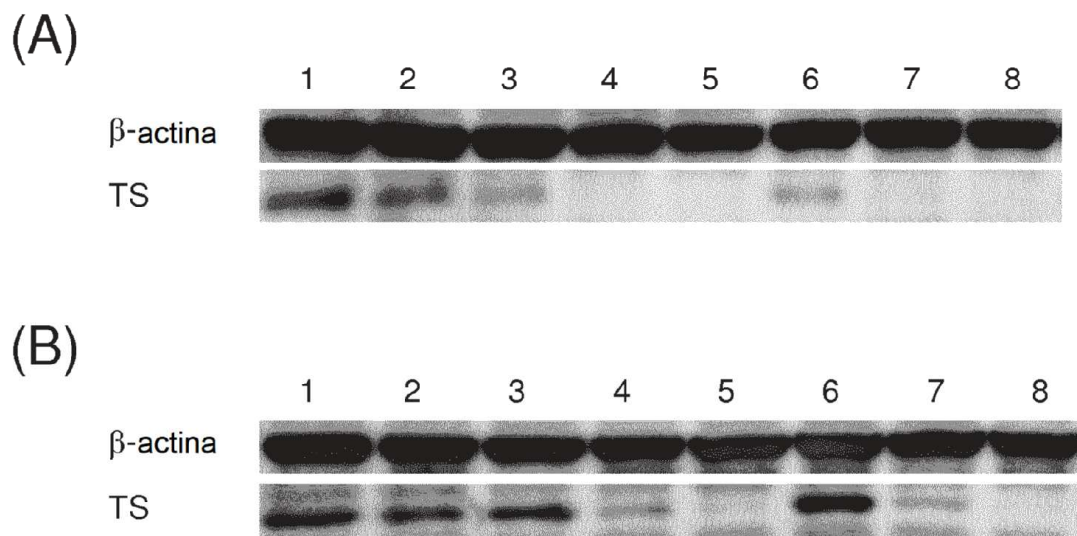


Fig. 2

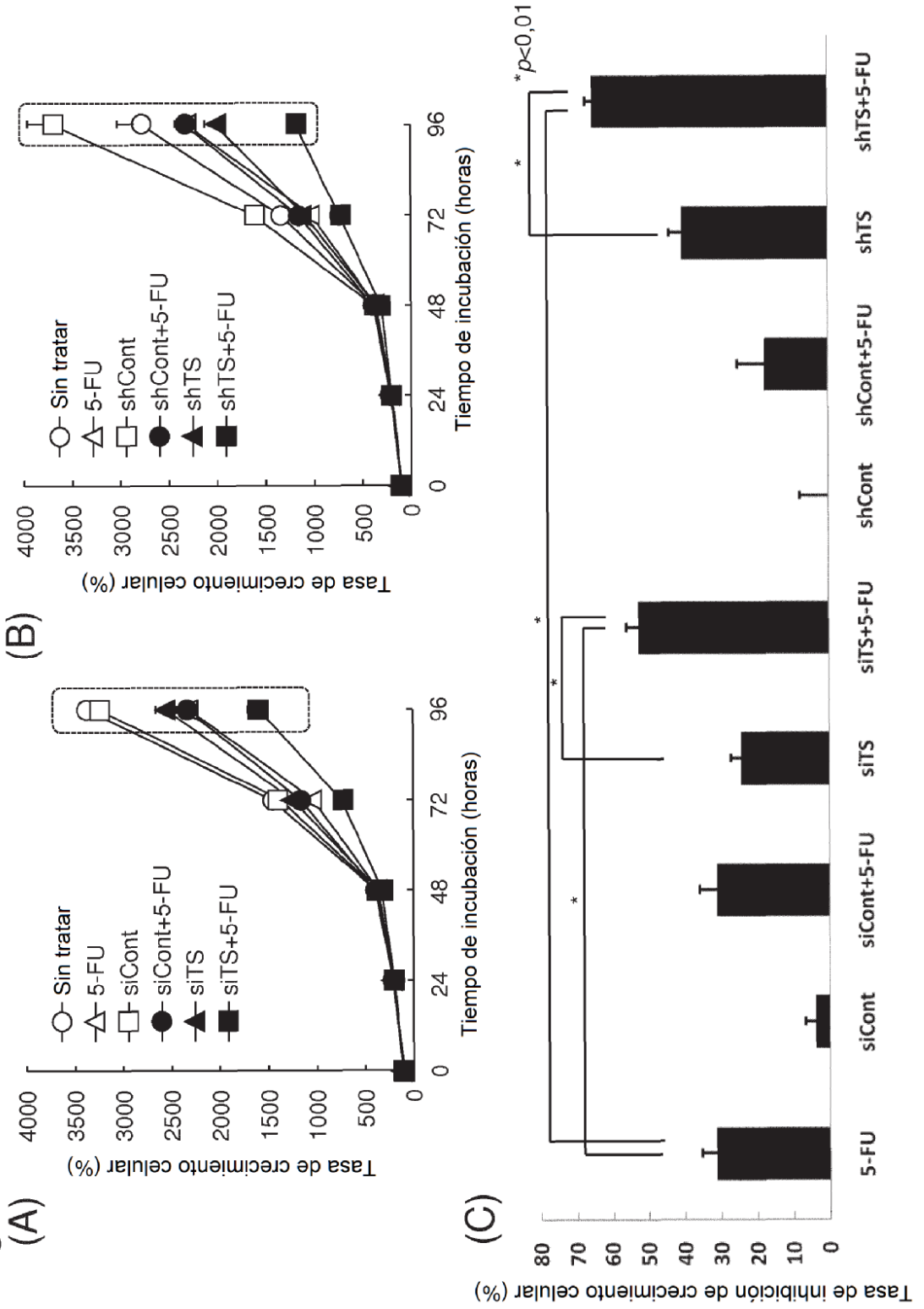


Fig. 3

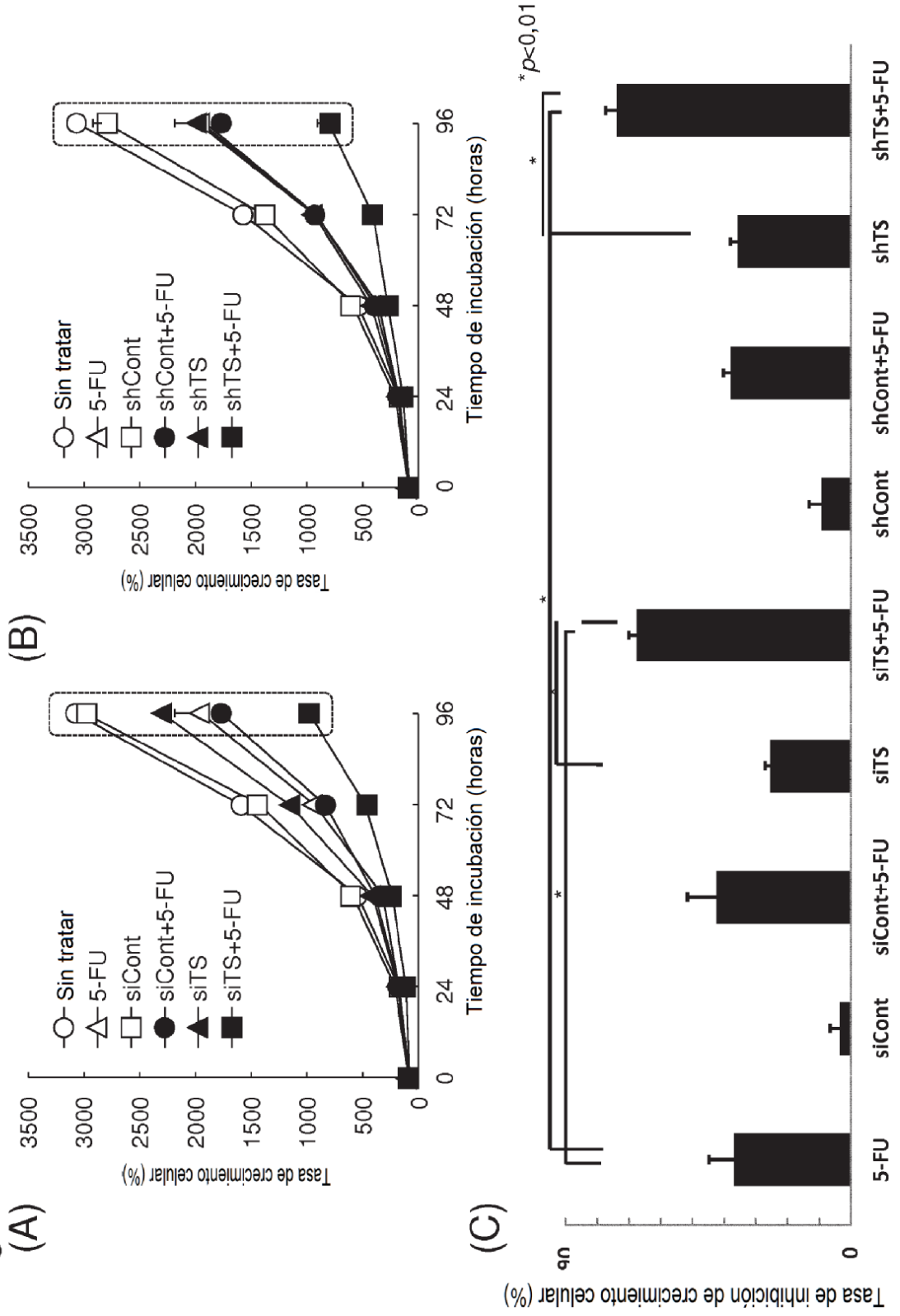


Fig. 4

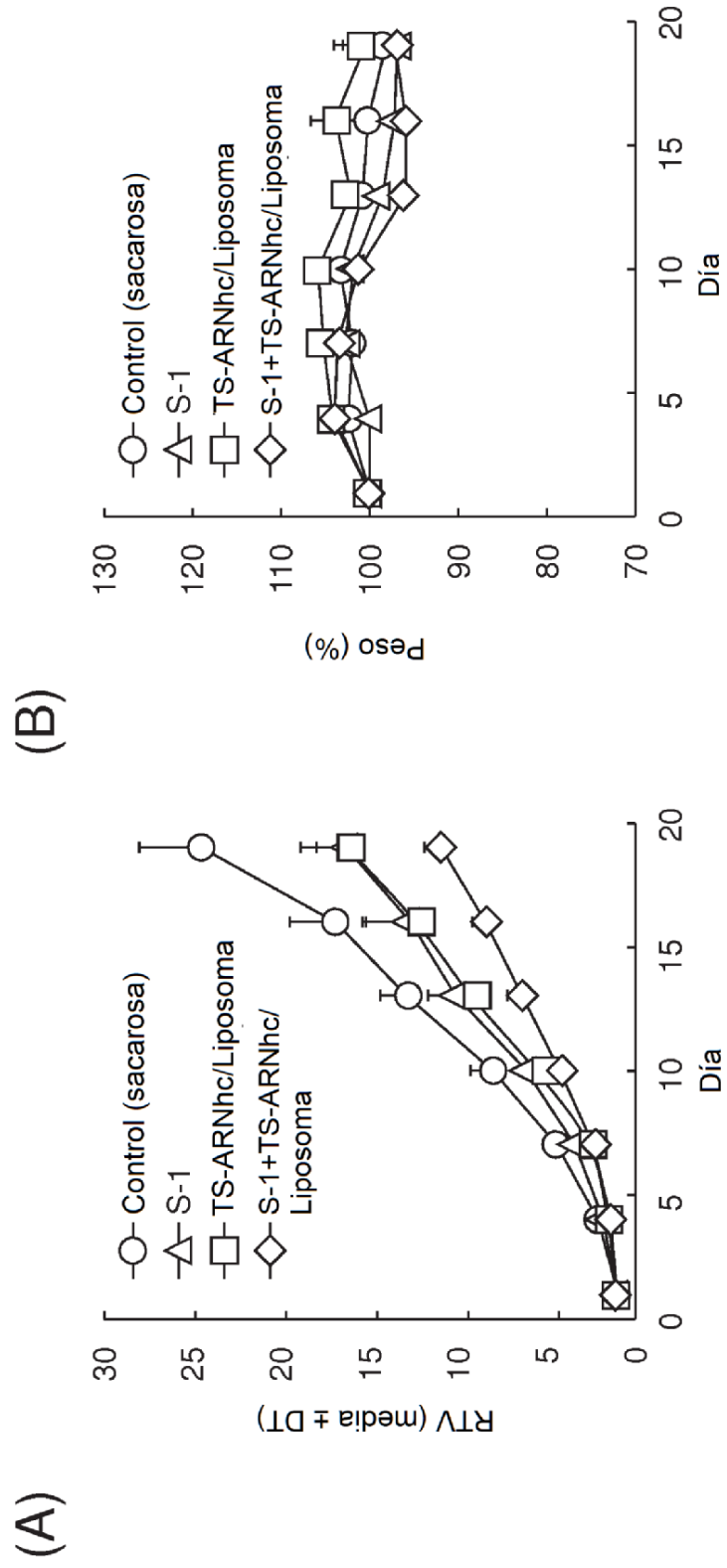


Fig. 5

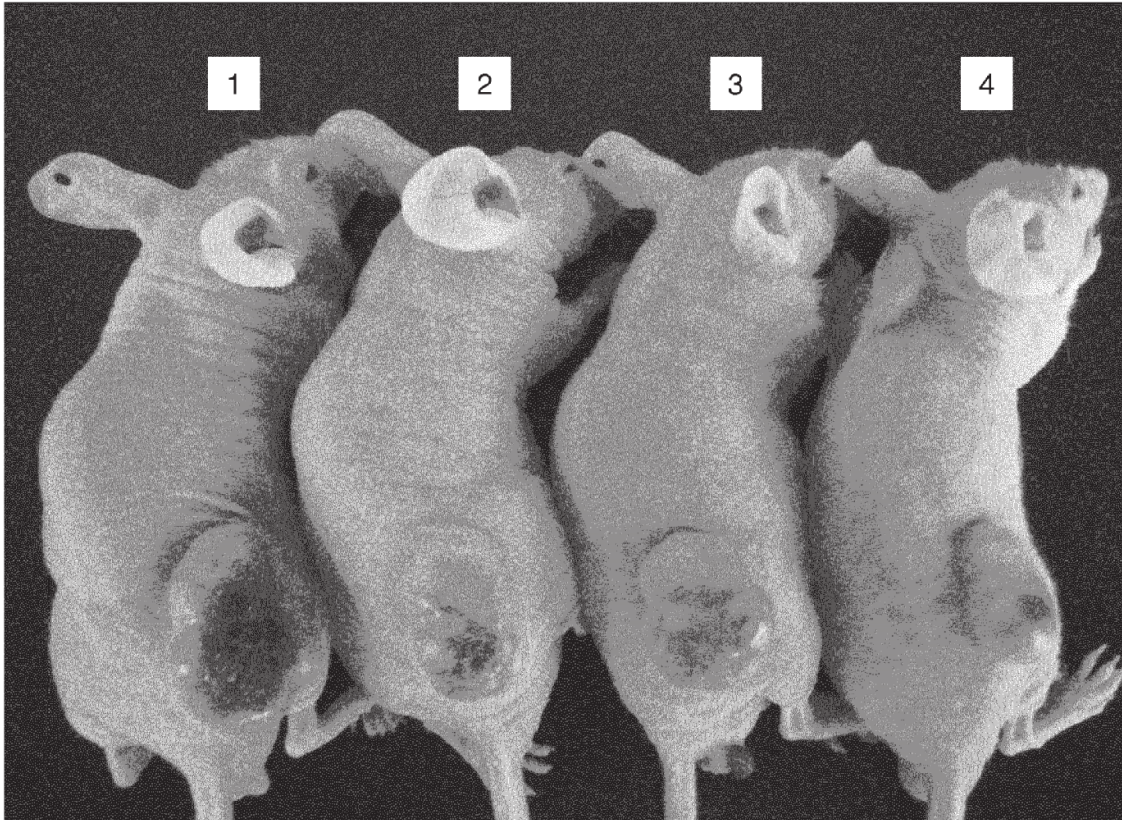
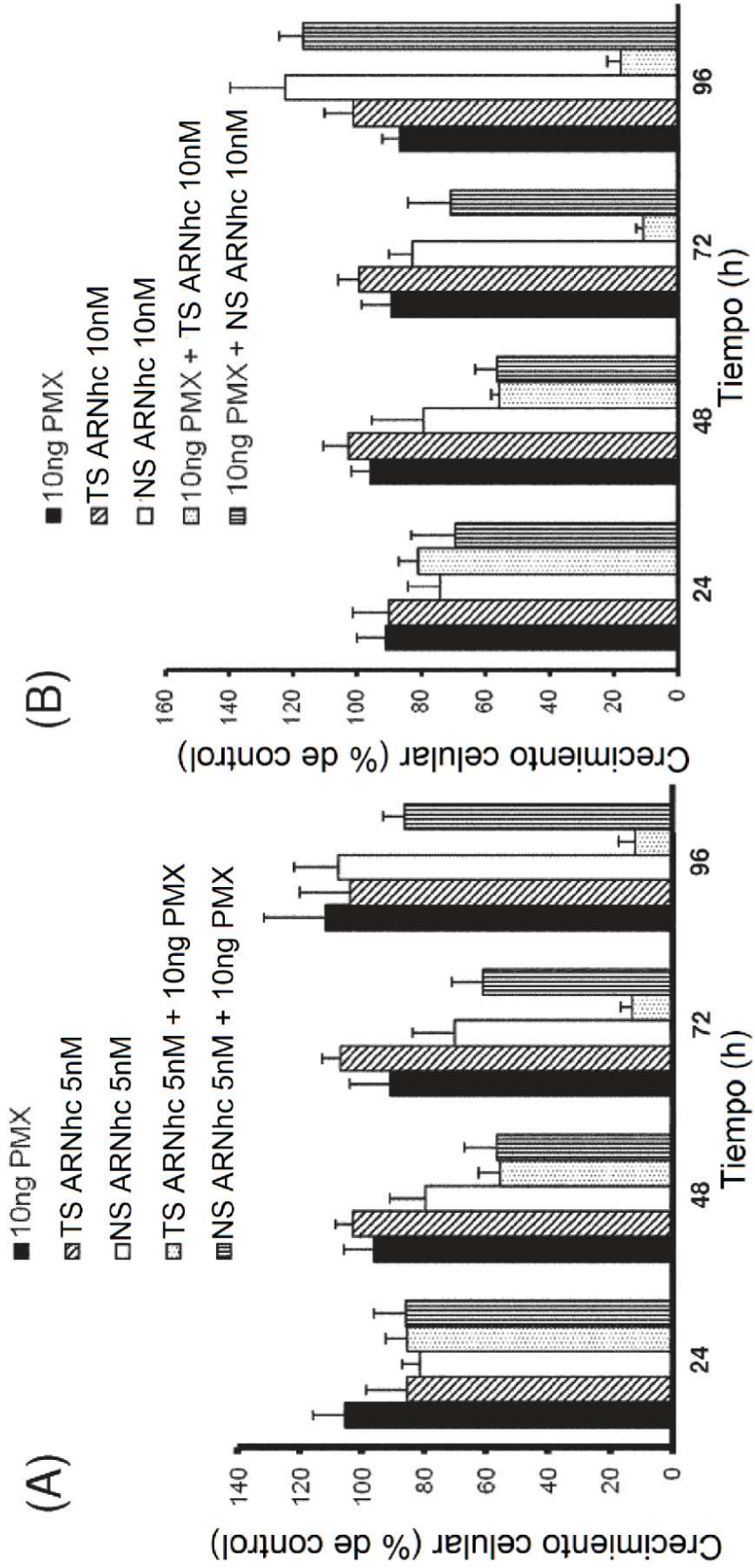


Fig. 6



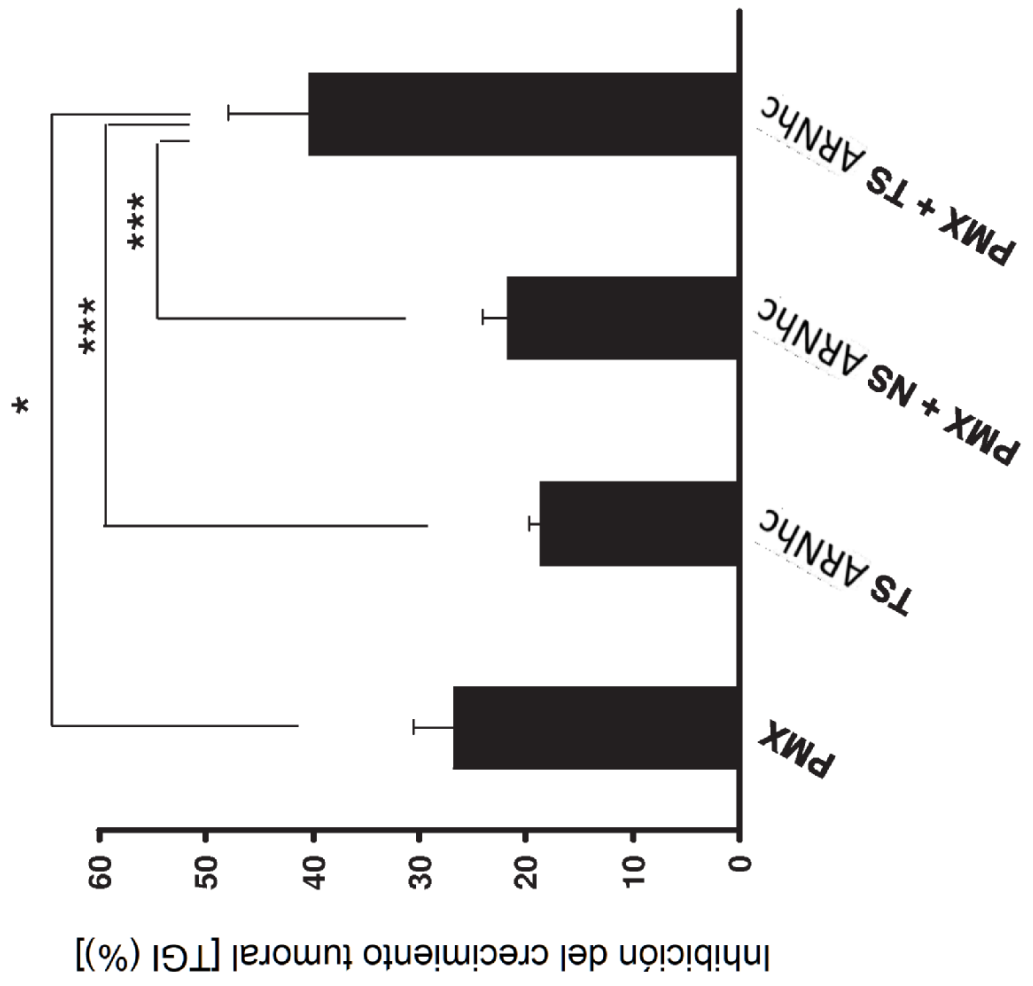


Fig. 7