

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 999**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7088 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07740105 .7**
- 96 Fecha de presentación: **28.03.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2009100**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-) y uso del mismo**

30 Prioridad:
29.03.2006 JP 2006092214

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.10.2012

73 Titular/es:
**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC.
13-9, ENOKI-CHO
SUITA-SHI, OSAKA 564-0053, JP**

72 Inventor/es:
**SUGIYAMA, Haruo y
OJI, Yusuke**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

ES 2 387 999 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

ARNsi ESPECÍFICO DE LA ISOFORMA WT1 17AA(-) Y USO DEL MISMO

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un ARNsi que actúa sobre un gen WT1, y uso del ARNsi. Específicamente, la presente invención se refiere a una supresión del crecimiento de un tumor sólido, y a una inducción de muerte celular en el tumor sólido, por medio de un ARNsi que suprime una expresión de la isoforma WT1 17AA(-).

10

Técnica anterior

El gen del tumor de Wilms (gen WT1) es un gen que codifica un factor de transcripción con dedos de cinc. En el gen WT1, se sabe que tiene lugar un splicing alternativo en el sitio de 17 aminoácidos (17AA) compuesto por un exón 5 en el gen WT1 y en el sitio de 3 aminoácidos (KTS) que existe entre un dedo de cinc 3 y un dedo de cinc 4 a fin de que se generen cuatro isoformas (17AA(+)KTS(+), 17AA(+)KTS(-), 17AA(-)KTS(+) y 17AA(-)KTS(-)). Las cuatro isoformas se expresan en un tumor sólido humano y una célula leucémica (véanse los Documentos 1 y 2, que no corresponden a una patente, por ejemplo).

20 El gen WT1 se ha considerado como un gen supresor de tumor. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que el gen WT1 funciona como un oncogén. Por ejemplo, los inventores de la presente invención han informado que un gen WT1 de tipo silvestre que no incluye una mutación en el mismo se expresa altamente en casi todas las células leucémicas, y un nivel de la expresión tiene una correlación inversa con el pronóstico de un paciente con leucemia (véanse los Documentos 3 y 4 que no corresponden a una patente, por ejemplo). También se ha informado por los inventores de la presente invención que un crecimiento de la célula leucémica se suprime específicamente transduciendo un ADN no codificante de WT1 en la célula leucémica (véase el Documento que no corresponde a una patente 5, por ejemplo), y la diferenciación de una célula precursora mielóide normal de ratón y una línea celular precursora mielóide 32D cl3 en un neutrófilo se suprimen mediante una expresión forzada del gen WT1 para crecer de forma proliferativa (véase el Documento que no corresponde a una patente 6, por ejemplo). En base a lo anterior, los inventores de la presente invención han indicado que el gen WT1 es el responsable de que una célula de linaje hematopoyético sea leucémica. Además, los inventores de la presente invención han informado que el gen WT1 de tipo natural se expresa altamente en diversos tumores sólidos (véanse los Documentos 7 a 14 que no corresponden a una patente, por ejemplo).

35 Se considera que las cuatro isoformas que se han mencionado anteriormente tienen diferentes funciones, respectivamente. Por ejemplo, se considera que la isoforma WT1 17AA(+)KTS(+) contribuye al crecimiento de células cancerosas (véase el Documento que no corresponde a una patente 15). Se considera que la isoforma WT1 17AA(+)KTS(-) es responsable de la formación de un tumor de linfoma maligno (véase el Documento 16 que no corresponde a una patente).

40

En los últimos años los inventores de la presente invención han demostrado que el ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(+) induce la apoptosis de una célula leucémica que expresa el gen WT1 (véase el Documento 17 que no corresponde a una patente).

45 [Documento 1 que no corresponde a una patente]

Oji Y. y col., Int. J. Cancer 100: 297 (2002)

[Documento 2 que no corresponde a una patente]

Siehl J. M. y col., Ann. Hematol. 83: 745 (2000)

[Documento 3 que no corresponde a una patente]

50 Inoue K. y col., Blood 84: 3071 (1994)

[Documento 4 que no corresponde a una patente]

Inoue K. y col., Blood 89: 1405 (1997)

[Documento 5 que no corresponde a una patente]

Yamaguchi T. y col., Blood 87: 2828 (1996)

55 [Documento 6 que no corresponde a una patente]

Inoue K. y col., Blood 91: 2969 (1998)

[Documento 7 que no corresponde a una patente]

Oji Y. y col., Japanese Journal of Cancer Research 90: 194 (1999)

[Documento 8 que no corresponde a una patente]

- Oji Y. y col., *Int J Cancer*; 100: 297-303 (2002)
 [Documento 9 que no corresponde a una patente]
 Ueda T. y col., *Cancer Science* 94: 271 (2003)
 [Documento 10 que no corresponde a una patente]
 5 Oji Y. y col., *Cancer Science* 94: 523 (2003)
 [Documento 11 que no corresponde a una patente]
 Oji Y. y col., *Cancer Science* 94: 606 (2003)
 [Documento 12 que no corresponde a una patente]
 Oji Y. y col., *Cancer Science* 94: 712 (2003)
 10 [Documento 13 que no corresponde a una patente]
 Oji Y. y col., *Neoplasma* 51: 17 (2004)
 [Documento 14 que no corresponde a una patente]
 Oji Y. y col., *Jpn. J. Clin. Oncol.* 34: 74 (2004)
 [Documento 15 que no corresponde a una patente]
 15 Hubinger G. y col., *Exp Hematol* 10: 1226-1235 (2001)
 [Documento 16 que no corresponde a una patente]
 Li H. y col., *Int J Hematol* 77: 463-470 (2003)
 [Documento 17 que no corresponde a una patente]
 Ito K. y col., *Oncogene*; Mar 6: 1 (2006)
 20 [Documento 18 que no corresponde a una patente]
 Englert C. y col., *Cancer Res* 8: 1429 – 1434 (1997)
 [Documento 19 que no corresponde a una patente]
 Loeb D. M. y col., *Leukemia* 17: 965 – 971 (2003)

25 Descripción de la invención

Como se ha descrito anteriormente, se considera que es posible aplicar una terapia de alcance molecular específicamente a una célula cancerosa suprimiendo una función de WT1 que tiene una función como oncogén. Sin embargo, una técnica que usa oligo-ADN no codificante o una ribozima, que se usa como un procedimiento
 30 convencional para la supresión de una expresión del gen WT1, podría no alcanzar una alta eficacia en la supresión de la expresión del gen WT1, o una alta especificidad, en una medida suficiente.

La presente invención se realiza en vista de los problemas anteriores, y un objeto de la presente invención es conseguir una terapia de alcance molecular específica de las células cancerosas que controle con éxito la función
 35 del WT1.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha indicado que la isoforma WT1 17AA(+) tiene una función de oncogén. Sin embargo, no se ha determinado una función de la isoforma WT1 17AA(–)KTS(+). Mientras tanto, se ha informado que la isoforma 17AA(–)KTS(–) induce un arresto en G1 en una célula de osteosarcoma (véase el
 40 Documento 18 que no corresponde a una patente), y promueve una diferenciación mediante la inhibición de la transición G1/S en una célula de línea célula precursora mielóide 32D cl3 (véase el Documento 19 que no corresponde a una patente). Además, un ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(–) no induce la apoptosis de una línea celular leucémica que expresa WT1 o una línea celular de linfoma que no expresa WT1 (véase el Documento 17 que no corresponde a una patente).

45 Los inventores de la presente invención han demostrado en primer lugar que, en una célula de un tumor sólido, la isoforma WT1 17AA(–)KTS(–) cumple una función como oncogén para cambiar un citoesqueleto controlando un nivel de expresión de una proteína de unión a actina (cofilina, actinina y gelsolina) para inducir un cambio en la forma de la célula, una mejora en el desplazamiento celular in vitro, y una mejora en la capacidad de la invasión
 50 celular. Además, los inventores de la presente invención han descubierto que puede inducirse una muerte celular específicamente en una célula tumoral inhibiendo específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(–). Basándose en lo anterior se realiza la presente invención.

Es decir, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención es un polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones y que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que
 55 incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27. Es preferible una disposición para que el polinucleótido tenga la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26.

Con la disposición, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede proporcionar un ARNsi que puede

inhibir específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) sin inhibir una expresión de la isoforma WT1 17AA(+).

5 La composición médica de acuerdo con la presente invención es una composición médica para el tratamiento de un tumor sólido de acuerdo con las reivindicaciones, que comprende uno cualquiera de: un ARN de doble hélice compuesto por (i) un primer ARN codificado por un ADN complementario con respecto a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27, y (ii) un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN; un ADN que codifica el ARN de doble hélice; y un vector en el que se inserta el ADN.

10 Teniendo en cuenta los informes anteriores acerca de la isoforma WT1 17AA(-), podría no haberse esperado que el ARNsi que inhibe específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-), que se ha considerado que funciona como un gen supresor de tumor, cumpla una función supresora de tumor.

15 Es preferible disponer la composición médica de acuerdo con la presente invención de manera que el ADN que codifica el segundo ARN hibride en una condición rigurosa con el polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27.

Es preferible disponer la composición médica de acuerdo con la presente invención de manera que el segundo ARN
20 incluya al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 29.

Es preferible disponer la composición médica de acuerdo con la presente invención de manera que el primer ARN incluya al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 30.

25 Es preferible disponer la composición médica de acuerdo con la presente invención de manera que el ADN que codifica el ARN de doble hélice incluya la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27.

Es preferible disponer la composición médica de acuerdo con la presente invención de manera que el ARN de doble hélice esté compuesto por un emparejamiento de ARN que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 29
30 incluyendo el ARN la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 30.

Es preferible que la célula a la cual la composición médica de acuerdo con la presente invención puede aplicarse, se seleccione entre un grupo que incluye cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de células escamosas de la piel, cáncer de cabeza y cuello (cáncer de células escamosas de la piel de la cabeza y el cuello, por ejemplo), cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), por ejemplo), tumor en el canal alimentario (tumor esofágico, cáncer de estómago, tumor del intestino delgado, tumor del intestino grueso), glioma, tumor mesotelial, y similares.

El kit médico de acuerdo con la presente invención es un kit médico de acuerdo con las reivindicaciones para el
40 tratamiento de un tumor sólido, que comprende uno cualquiera de: un ARN de doble hélice compuesto por (i) un primer ARN codificado por un ADN complementario con respecto a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27, y (ii) un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN; un ADN que codifica el ARN de doble hélice; y un vector en el que se inserta el ADN. La presente invención también se refiere al uso de ARN de doble hélice de
45 acuerdo con las reivindicaciones.

También se describe un procedimiento que no forma parte de la presente invención que es un procedimiento para tratar un tumor sólido, que comprende la etapa de administrar, a una célula que forma el tumor sólido, un ARN de doble hélice compuesto por (i) un primer ARN codificado por un ADN complementario con respecto a un
50 polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27, y (ii) un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN, de tal manera que el ARN de doble hélice se expresará en la célula.

Es preferible disponer el procedimiento de manera que la etapa de administración se realice transduciendo, en la
55 célula diana, un vector en el que se inserta un polinucleótido que incluye el primer ARN y el segundo ARN.

También se describe un agente inductor de muerte celular que es un agente inductor de muerte celular para tratar un tumor sólido, que comprende uno cualquiera de: un ARN de doble hélice compuesto por (i) un primer ARN codificado por un ADN complementario con respecto a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en

la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27, y (ii) un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN; un ADN que codifica el ARN de doble hélice; y un vector en el que se inserta el ADN.

5 Es preferible disponer el agente inductor de muerte celular de manera que el ADN que codifica el segundo ARN hibride en una condición rigurosa con el polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27.

Es preferible disponer el agente inductor de muerte celular de manera que el segundo ARN incluya al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 29.

Es preferible disponer el agente inductor de muerte celular de manera que el primer ARN incluya al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 30.

15 Es preferible disponer el agente inductor de muerte celular de manera que el ADN que codifica el ARN de doble hélice incluya la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27.

Es preferible disponer el agente inductor de muerte celular de manera que el ARN de doble hélice esté compuesto por un emparejamiento del ARN que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 29 con el ARN que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 30.

Es preferible que la célula a la que el agente inductor de muerte celular puede aplicarse se seleccione entre un grupo que incluye cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de células escamosas de la piel, cáncer de cabeza y cuello (cáncer de células escamosas de la piel de la cabeza y el cuello, por ejemplo), cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), por ejemplo), tumor en el canal alimentario (tumor esofágico, cáncer de estómago, tumor del intestino delgado, tumor del intestino grueso), glioma, tumor mesotelial y similares.

También se describe un kit inductor de muerte celular que es un kit inductor de muerte celular para inducir la apoptosis de una célula que forma un tumor sólido, que comprende uno cualquiera de: un ARN de doble hélice compuesto por (i) un primer ARN codificado por un ADN complementario con respecto a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27, y (ii) un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN; un ADN que codifica el ARN de doble hélice; y un vector en el que se inserta el ADN.

35 También se describe un procedimiento para inducir una muerte celular que es un procedimiento para la inducción de la apoptosis de una célula que forma un tumor sólido, que comprende la etapa de administrar, a la célula, un ARN de doble hélice compuesto por (i) un primer ARN codificado por un ADN complementario con respecto a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27, y (ii) un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN, de tal manera que el ARN de doble hélice se expresará en la célula.

Es preferible disponer el procedimiento para inducir una muerte celular de manera que la etapa de administración se realice transduciendo, en la célula diana, un vector en el que se inserta un polinucleótido que incluye el primer ARN y el segundo ARN.

45 Para un entendimiento más completo de los otros objetos, características y ventajas de la presente invención, debe hacerse referencia a la siguiente descripción detallada. Las ventajas de la presente invención pueden especificarse con la descripción tomada en conjunto con los dibujos adjuntos.

50 Breve descripción de los dibujos

[Figura 1 (a)]

La figura 1 (a) es una vista que muestra un cambio morfológico de una célula TYK de cáncer de ovario inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 1 (a) muestra, como ejemplo, los resultados de la transferencia Western que muestran la presencia o ausencia de expresiones de proteínas WT1 en cuatro líneas celulares TYK (estando cada una transducida con una de cuatro isoformas WT1 diferentes).

[Figura 1(b)]

La figura 1(b) es una vista que muestra un cambio morfológico de una célula TYK de cáncer de ovario inducido por

una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 1(b) muestra, como ejemplo, un cambio en la morfología celular provocada por expresiones estables de cada isoforma WT1 en células TYK.

[Figura 1(c)]

- 5 La figura 1(c) es una vista que muestra un cambio morfológico de una célula TYK de cáncer de ovario inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 1(c) muestra los promedios de las áreas relativas de ocho o más células individuales obtenidas de tres clones celulares.

[Figura 2(a)]

- 10 La figura 2(a) es una vista que muestra un cambio morfológico de diversos tipos de células cancerosas inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). En la figura 2(a), se analizaron morfológicamente diversos tipos de células cancerosas (ZR-75, HT-1080, MKN28, SKBr3 y TE10, por ejemplo), en las que la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) marcada con GFP se expresó de forma transitoria, usando un microscopio confocal de 48 a 72 horas después de la transfección.

15

[Figura 2(b)]

La figura 2(b) es una vista que muestra un cambio morfológico de diversos tipos de células cancerosas inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 2(b) muestra los promedios de las áreas relativas de nueve o más células individuales.

20

[Figura 3(a)]

La figura 3(a) es una vista que muestra una supresión de la adhesión celular a un sustrato inducida por una expresión estable de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK transducidas con un vector de control se analizaron con respecto a la adhesión celular a un sustrato usando un ensayo de unión celular.

25

[Figura 3(b)]

La figura 3(b) es una vista que muestra una supresión de la adhesión celular a un sustrato inducida por una expresión estable de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK transducidas con un vector de control se analizaron con respecto a la resistencia de la adhesión celular a un sustrato usando un ensayo de desprendimiento celular.

30

[Figura 4(a)]

La figura 4(a) es una vista que muestra una mejora de la migración celular inducida por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Se registraron los desplazamientos de las células TYK individuales que expresaban la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK individuales que no expresaban la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-) durante 5 horas a intervalos de 2 minutos usando un grabador de vídeo con lapso de tiempo. Se calculó la velocidad de los desplazamientos de las células.

35

40 [Figura 4(b)]

La figura 4(b) es una vista que muestra una mejora de la migración celular inducida por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Las células TYK (■) transducidas con un vector de expresión de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK (□) transducidas con un vector de control se analizaron con respecto a la migración colectiva usando un ensayo de curación de herida.

45

[Figura 4(c)]

La figura 4(c) es una vista que muestra una mejora de la migración celular inducida por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Las células TYK (■) transducidas con un vector de expresión de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK (□) transducidas con un vector de control se analizaron con respecto a la quimiotaxis hacia medio de Eagle modificado por Dulbecco que incluye FBS al 5 % usando un ensayo de migración Transwell.

50

[Figura 5(a)]

La figura 5(a) es una vista que muestra un cambio de expresiones de la actina filamentosa (actina F) y las proteínas de unión a actina (ABP) inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 5(a) muestra un resultado de una tinción inmunohistoquímica para la actina F, la vinculina (proteína de adhesión focal) y los núcleos en una célula TYK transducida con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y en una célula TYK transducida con un vector de control.

55

[Figura 5(b)]

La figura 5(b) es una vista que muestra un cambio de expresiones de la actina fibrosa (actina F) y las proteínas de unión a actina (ABP) inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). El lisado (hileras 1 y 2) de células individuales transducidas con un vector de control y el lisado (hileras 3 y 4) de células individuales transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de actina total, actina F, α -tubulina y GAPH, respectivamente.

[Figura 5(c)]

La figura 5(c) es una vista que muestra un cambio de expresiones de la actina fibrosa (actina F) y las proteínas de unión a actina (ABP) inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Las expresiones del ARNm en clones celulares TYK aislados individualmente (n = 3, hileras 1 a 3) transducidos con un vector de control y en clones celulares TYK aislados individualmente (n = 3, hileras 4 a 6) transducidos con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se analizaron por RT-PCR en una condición descrita en la Tabla 1.

15 [Figura 5(d)]

La figura 5(d) es una vista que muestra un cambio de expresiones de la actina fibrosa (actina F) y las proteínas de unión a actina (ABP) inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Los clones celulares TYK (hileras 1 y 2) transducidos con un vector de control y el clon celular TYK (hileras 3 y 4) transducido con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de α -actinina 1, cofilina y gelsolina, respectivamente.

[Figura 5(e)]

La figura 5(e) es una vista que muestra un cambio de expresiones de la actina fibrosa (actina F) y las proteínas de unión a actina (ABP) inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Se realizó la tinción inmunohistoquímica de α -actinina 1, cofilina y gelsolina en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) o con un vector de control. Al mismo tiempo, se tiñeron los núcleos celulares con yoduro de propidio.

[Figura 5(f)]

30 La figura 5(f) es una vista que muestra un cambio de expresiones de la actina fibrosa (actina F) y las proteínas de unión a actina (ABP) inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Los clones celulares HT-1080 transducidos con un vector de control o con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de α -actinina 1, cofilina y gelsolina, respectivamente.

35 [Figura 5(g)]

La figura 5(g) es una vista que muestra un cambio de expresiones de la actina fibrosa (actina F) y las proteínas de unión a actina (ABP) inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Los clones celulares TE10 transducidos con un vector de control o con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de α -actinina 1, cofilina y gelsolina, respectivamente.

40

[Figura 6(a)]

La figura 6(a) es una vista que muestra que un fenotipo de una célula TYK, en la que las expresiones estables de la α -actinina y la cofilina se indujeron transduciendo la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se restauró en un fenotipo de su célula TYK precursora. Un vector de expresión de α -actinina y un vector de expresión de cofilina (TW/ACTN-CFL) o un vector de control se cotransfectaron en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 6(a) muestra los niveles de expresión de la α -actinina y la cofilina, que se determinaron mediante transferencia Western.

[Figura 6(b)]

50 La figura 6(b) es una vista que muestra que un fenotipo de una célula TYK, en la que las expresiones estables de la α -actinina y la cofilina se indujeron transduciendo la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se restauró en un fenotipo de su célula TYK precursora. Un vector de expresión de α -actinina y un vector de expresión de cofilina (TW/ACTN-CFL) o un vector de control se cotransfectaron en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 6(b) muestra las células teñidas con May Grunwald-Giemsa.

55

[Figura 6(c)]

La figura 6(c) es una vista que muestra que un fenotipo de una célula TYK, en la que las expresiones estables de la α -actinina y la cofilina se indujeron transduciendo la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se restauró en un fenotipo de

su célula TYK precursora. Un vector de expresión de α -actinina y un vector de expresión de cofilina (TW/ACTN-CFL) o un vector de control se cotransfectaron en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 6(c) muestra áreas celulares calculadas mediante el software NIH Image (1: clon celular TW/Mock; 2 y 3: clones celulares TW/ACTN-CFL diferentes, respectivamente).

5

[Figura 6(d)]

La figura 6(d) es una vista que muestra que un fenotipo de una célula TYK, en la que las expresiones estables de la α -actinina y la cofilina se indujeron transduciendo la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se restauró en un fenotipo de su célula TYK precursora. Un vector de expresión de α -actinina y un vector de expresión de cofilina (TW/ACTN-CFL) o un vector de control se cotransfectaron en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 6(d) muestra una adhesión celular a un sustrato determinado por un ensayo de desprendimiento.

10

[Figura 6(e)]

La figura 6(e) es una vista que muestra que un fenotipo de una célula TYK, en la que las expresiones estables de la α -actinina y la cofilina se indujeron transduciendo la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se restauró en un fenotipo de su célula TYK precursora. Un vector de expresión de α -actinina y un vector de expresión de cofilina (TW/ACTN-CFL) o un vector de control se cotransfectaron en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 6(e) muestra una migración celular colectiva analizada por un ensayo de curación de herida. La migración celular se representa como un promedio de la proporción (porcentaje) de la longitud de las protrusiones con respecto a la anchura del primer desprendimiento de células en tres sitios diferentes.

15

20

[Figura 6(f)]

La figura 6(f) es una vista que muestra que un fenotipo de una célula TYK, en la que las expresiones estables de la α -actinina y la cofilina se indujeron transduciendo la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se restauró en un fenotipo de su célula TYK precursora. Un vector de expresión de α -actinina y un vector de expresión de cofilina (TW/ACTN-CFL) o un vector de control se cotransfectaron en una célula TYK transducida con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 6(f) muestra un nivel de expresión de gelsolina, que se determinó mediante transferencia Western.

25

30

[Figura 7(a)]

La figura 7(a) es una vista que muestra que una supresión de la expresión de gelsolina redujo una migración celular, sin embargo, no afectó a la morfología celular ni a una adhesión celular a un sustrato. Un vector de ARNsi específico de gelsolina (TW/GSNsiRNA) o un vector de control (TW/siMock) se transdujo en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 7(a) muestra un nivel de expresión de la proteína gelsolina, que se determinó por transferencia Western.

35

[Figura 7(b)]

La figura 7(b) es una vista que muestra que una supresión de la expresión de gelsolina redujo una migración celular, sin embargo, no afectó a la morfología celular ni a una adhesión celular a un sustrato. Un vector de ARNsi específico de gelsolina (TW/GSNsiRNA) o un vector de control (TW/siMock) se transdujo en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 7(b) muestra las células teñidas con May Grunwald-Giemsa.

40

[Figura 7(c)]

La figura 7(c) es una vista que muestra que una supresión de la expresión de gelsolina redujo una migración celular, sin embargo, no afectó a la morfología celular ni a una adhesión celular a un sustrato. Un vector de ARNsi específico de gelsolina (TW/GSNsiRNA) o un vector de control (TW/siMock) se transdujo en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 7(c) muestra las áreas del clon celular TW/Mock y el clon celular TW/GSNsiRNA, que se calcularon mediante el software NIH Image.

45

[Figura 7(d)]

La figura 7(d) es una vista que muestra que una supresión de la expresión de gelsolina redujo una migración celular, sin embargo, no afectó a la morfología celular ni a una adhesión celular a un sustrato. Un vector de ARNsi específico de gelsolina (TW/GSNsiRNA) o un vector de control (TW/siMock) se transdujo en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 7(d) muestra una adhesión celular a un sustrato determinada por un ensayo de desprendimiento.

50

55

[Figura 7(e)]

La figura 7(e) es una vista que muestra que una supresión de la expresión de gelsolina redujo una migración celular, sin embargo, no afectó a la morfología celular ni a una adhesión celular a un sustrato. Un vector de ARNsi específico de gelsolina (TW/GSNsiRNA) o un vector de control (TW/siMock) se transdujo en las células TYK transducidas con

la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 7(e) muestra un desplazamiento celular colectivo analizado por un ensayo de curación de herida.

[Figura 7(f)]

- 5 La figura 7(f) es una vista que muestra que una supresión de la expresión de gelsolina redujo una migración celular, sin embargo, no afectó a la morfología celular ni a una adhesión celular a un sustrato. Un vector de ARNsi específico de gelsolina (TW/GSNsiRNA) o un vector de control (TW/siMock) se transdujo en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 7(f) muestra los niveles de expresión de la α -actinina 1 y la cofilina, que se determinaron por transferencia Western.

10

[Figura 8]

La figura 8 es una vista que muestra una posibilidad de función de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) en el control de la dinámica citoesquelética.

- 15 [Figura 9]

La figura 9 es una vista esquemática que muestra un sitio diana de un vector de ARNsi para suprimir específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-).

[Figura 10]

- 20 La figura 10 es una vista que muestra la presencia o ausencia de inducción de apoptosis provocada por la transducción de un vector de ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-) en células que expresan WT1 o células que no expresan WT1.

[Figura 11]

- 25 La figura 11 es una vista que muestra la supresión de una formación tumoral en un ratón trasplantado por vía subcutánea con una célula de tumor humano provocado por la supresión de una expresión de la isoforma WT1 17AA(-).

Mejor modo de realizar la invención

30

[1] ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-)

La presente invención se refiere a un polinucleótido para proporcionar un ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-).

35

Recientemente, llama mucho la atención una técnica de interferencia de ARN (ARNi) como terapia de alcance molecular. El ARNi, que se inicia con ADN de doble hélice (ADNdh), es un procedimiento silenciador postranscripcional del gen en el que el ARNsi provoca una degradación de su ARN homólogo, que se realiza específicamente en la secuencia.

40

Es necesario que el ARNsi sea lo suficientemente largo para realizar una supresión de expresión específica del gen. Al mismo tiempo, es necesario que el ARNsi sea lo suficientemente corto para evitar influencias adversas sobre una célula mamífera. Por lo tanto, el ARNsi es preferentemente un par de bases nucleotídicas que tiene de 15 a 49 bases de longitud, más preferentemente un par de bases nucleotídicas que tienen de 15 a 30 bases de longitud.

45

- Por lo tanto, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 e incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27. Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que un splicing alternativo tiene lugar en dos sitios en un gen WT1 a fin de que se generen cuatro isoformas, que son 17AA(+)KTS(+) (SEQ ID NO: 32 y 33), 17AA(+)KTS(-) (SEQ ID NO: 34 y 35), 17AA(-)KTS(+) (SEQ ID NO: 36 y 37) y 17AA(-)KTS(-) (SEQ ID NO: 38 y 39). Ya que las secuencias de bases de la SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 se generan por un splicing alternativo en el sitio 17AA, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede proporcionar, con la disposición anterior, un ARNsi capaz de inhibir específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) sin inhibir una expresión de la isoforma WT1 17AA(+).

55

Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos, y se usa de forma intercambiable con "gen", "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico". Además, la expresión "secuencia de bases" que se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una secuencia de desoxirribonucleótidos (abreviados como A, G, C y T), y se usa de forma intercambiable con "secuencia de ácido

nucleico" o "secuencia nucleotídica".

El polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede existir en forma de ARN (ARNm, por ejemplo) o ADN (ADNc o ADN genómico, por ejemplo). El ADN puede ser de doble hélice o de una sola hélice. El ADN de una sola hélice o el ARN de una sola hélice puede ser una hebra codificante (conocida como hebra de sentido directo) o una hebra no codificante (conocida como una hebra de sentido contrario).

Un polinucleótido corto se representa como un dinucleótido (dímero) y un trinucleótido (trímero). Un polinucleótido largo se representa usando el número de nucleótidos polimerizados, como 30 mer o 100 mer. El polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede producirse como un fragmento de un polinucleótido más largo o puede sintetizarse químicamente.

Es preferible que el ARNsi producido con el polinucleótido de acuerdo con la presente invención sea ARN de doble hélice compuesto por (i) un primer ARN codificado por un ADN complementario con respecto a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27, y (ii) un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN. Sin embargo, el ARNsi puede facilitarse como ADN que codifica el ARN de doble hélice o como un vector en el que se inserta el ADN que codifica el ARN de doble hélice.

Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-)" se usa de forma intercambiable con "ARNsi de 17AA(-)". Proporcionándose el polinucleótido como una secuencia diana, el ARNsi de 17AA(-) puede producirse fácilmente mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. El ARNsi de 17AA(-) puede sintetizarse químicamente o puede producirse mediante una expresión recombinante, por ejemplo.

Como se ha descrito anteriormente, el ARNsi de 17AA(-) es preferentemente un par de bases nucleotídicas que tienen de 15 a 49 bases de longitud, más preferentemente un par de bases nucleotídicas que tienen de 15 a 30 bases de longitud. Se ha de observar que, en la presente memoria descriptiva, las hebras del ARNsi no tienen que estar completamente emparejadas entre sí, excepto en una región en la que las hebras se emparejen entre sí como ARNds, y el ARNsi puede incluir sitios sin emparejar que tienen lugar debido a un par de bases que no coinciden y similares.

Además, el ARNsi de 17AA(-) puede o no tener una protrusión en sus extremos. En el caso de que el ARNsi de 17AA(-) tenga la protrusión, el número de bases incluidas en la protrusión no se limita mientras pueda inducirse un efecto ARNi.

En el ARNsi de 17AA(-), es preferible que el ADN que codifica el segundo ARN pueda hibridar en una condición rigurosa con el polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27.

La hibridación puede realizarse mediante un procedimiento bien conocido, tal como uno descrito en Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989). En general, cuanto más alta es la temperatura o cuanto más alta es la concentración de sal, mayor es la rigurosidad que puede proporcionarse (una condición más difícil de hibridación), lo que permite obtener polinucleótidos que tengan una homología mayor. Una temperatura adecuada de hibridación difiere dependiendo de un factor, tal como una secuencia de bases y la longitud de la secuencia de bases. Por ejemplo, en el caso en el que se use un fragmento de ADN compuesto por 18 bases que codifica 6 aminoácidos como sonda, es preferible disponer la temperatura a 50 °C o inferior.

Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "una condición rigurosa de hibridación" se refiere a tal condición en la que se incuban los polinucleótidos durante una noche a 42 °C en una solución de hibridación (formamida al 50 %, 5 x SSC (incluyendo NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado), y después un filtro se lava en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C. Un polinucleótido que "parcialmente" hibrida en otro polinucleótido propone un polinucleótido (ADN o ARN) que hibrida en al menos 15 nucleótidos (nt), preferentemente al menos aproximadamente 20 nt, más preferentemente al menos aproximadamente 30 nt, de forma adicional preferentemente más de 30 nt de un polinucleótido de referencia. El polinucleótido que "parcialmente" hibrida en otro polinucleótido es también útil para una sonda de detección.

En el caso de que el ARNsi de 17AA(-) se proporcione como ARNds, es preferible que el ARNsi de 17AA(-) esté

compuesto por un emparejamiento de ARN que incluya la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 29, incluyendo el ARN la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 30.

En el caso de que el ARNsi de 17AA(-) se proporcione como un ADN que codifica el ARNsi o como un vector en el que se inserta el ADN, es preferible que el segundo ARN incluya al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 29, y que el primer ARN incluya al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 30. Además, es preferible que el primer ARN y el segundo ARN (o un ADN que codifica el primer ARN o el segundo ARN) se combinen entre sí a través de un polinucleótido compuesto por la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 31 para formar la horquilla de ARN (tallo-lazo). Sin embargo, la presente realización no se limita a esto.

Usando un vector de expresión de ARNsi, es decir, un vector de ADN obtenido insertando, en forma de un fragmento de ADN foráneo, un ADN que corresponde al ARNsi, es posible hacer que el ARNsi de 17AA(-) exprese y actúe en el cuerpo de forma eficaz. Por consiguiente, un vector de ADN de este tipo puede seleccionarse entre diversas series de vectores que se conocen en la técnica. Ha de apreciarse que el fragmento de ADN que corresponde al ARNsi de 17AA(-) puede prepararse fácilmente mediante un procedimiento conocido en la técnica.

Como el vector de expresión anterior, se conoce un vector tal como "del tipo horquillado" o "del tipo tallo-lazo" cuya secuencia de ADN correspondiente a una hebra codificante del ARNsi y la secuencia de ADN correspondiente a una hebra no codificante del ARNsi se codifican con una hebra de ADN en la dirección 3' de un promotor. El fragmento de ADN que se inserta en un vector de este tipo produce un ARN del tipo horquillado (del tipo tallo-lazo) después de que se transcriba en el cuerpo, y produce el ARNsi como resultado de reacciones enzimáticas.

El vector de expresión de ARNsi puede producirse fácilmente usando un procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Un vector de expresión de este tipo puede ser, pero sin limitación, diversos tipos de vectores víricos (vector adenoviral, vector vírico adeno-asociado, y similares), por ejemplo. El vector adenoviral permite transducir un gen en una célula que tiene una velocidad lenta de división celular (una célula nerviosa y similar, por ejemplo), y consigue una transducción de alta eficacia.

El propio ARN es una sustancia inestable, y se degrada por una ribonucleasa y similar al inyectarse en la sangre. Sin embargo, el ARNsi de 17AA(-) puede aplicarse a un tratamiento de tumor sólido usando un sistema de administración de fármacos (DDS, *Drug Delivery System*), que se conoce en la técnica, y similares. El ARNsi de 17AA(-) se encapsula en un vehículo, tal como un liposoma funcional, una micela polimérica, y similares, o se modifica con PEG y similares en sus dos extremos para ser estable en la sangre y/o una célula.

[2] Uso del ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-)

(1) Composición médica

La presente invención proporciona una composición médica de acuerdo con las reivindicaciones que comprende un ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-) (ARNsi de 17AA(-)). La composición médica de acuerdo con la presente invención es eficaz en el tratamiento de un tumor sólido.

La composición médica de acuerdo con la presente invención comprende uno de: un ARN de doble hélice que tiene un primer ARN codificado por un ADN complementario con respecto a un polinucleótido que está compuesto por al menos 15 bases contiguas en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 27, y un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN; un ADN que codifica el ARN de doble hélice; y un vector en el que se inserta el ADN.

"Tumor" es conocido como una neoplasia, y es un nuevo crecimiento que incluye una célula neoplásica. Además, la "célula neoplásica" también se conoce como una célula que tiene un problema de crecimiento, y proporciona una célula que crece de forma proliferativa a una velocidad extremadamente alta. La neoplasia es un tejido que crece anormalmente, y en general, forma por separado una agregación. Las agregaciones crecen más rápidamente que un tejido que crece normalmente. La neoplasia tiene defectos de forma parcial o completamente en la formación de una estructura junto con un tejido normal, y/o en el funcionamiento en cooperación con el tejido normal.

El tumor puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). El tumor maligno puede clasificarse en tres tipos principales. Un tumor maligno que desarrolla una estructura epitelial se describe como carcinoma. Un tumor maligno que tiene su origen en los tejidos conectivos, tales como los músculos, tejidos cartilagosos, grasas o

huesos, se describe como sarcoma. Un tumor maligno que afecta a una estructura hematopoyética (estructura responsable de la producción de glóbulos rojos) que incluye componentes del sistema inmune se describe como leucemia o linfoma. Otra neoplasia puede ser, pero sin limitación, neurofibroma.

- 5 El cáncer (tumor) puede dividirse en los dos tipos siguientes: 1) uno que crece al mismo tiempo según se mueve constantemente en la sangre después de convertirse en maligno, y que se extiende a los tejidos hematopoyéticos y otros órganos por todo el cuerpo, a pesar de ser un tejido hematopoyético o un tejido linfático (por ejemplo, leucemia); 2) uno que existe en un tejido u órgano particular como una masa tumoral (por ejemplo, muchos tumores distintos de leucemia). Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "tumor sólido" se refiere a un tumor distinto de leucemia. El tumor sólido al que puede aplicarse la composición médica de acuerdo con la presente invención se refiere particularmente a un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de células escamosas de la piel, un cáncer de cabeza y cuello (cáncer de células escamosas de la piel de la cabeza y el cuello, por ejemplo), un cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), por ejemplo), un tumor en el canal alimentario (tumor esofágico, cáncer de estómago, tumor del intestino delgado, tumor del intestino grueso), glioma, un tumor mesotelial, y similares.

- 20 Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, el término "tratamiento" se refiere a un alivio o eliminación de un síntoma, e incluye cualquier procedimiento realizado de forma profiláctica (antes de la aparición del síntoma) y terapéutica (después de la aparición del síntoma). La expresión "tratar un tumor sólido" se refiere a la supresión o prevención del crecimiento (proliferación) del tumor sólido. La expresión "tratar un tumor sólido" también se refiere a que, usando un procedimiento para el procesamiento del tumor sólido, el tumor sólido se vuelva más ligero y más pequeño que el mismo tumor al que no se aplica el procedimiento. Es preferible que el crecimiento (proliferación) del tumor sólido se suprima hasta tal punto que el tumor presente una disminución neta de peso y tamaño.
- 25 La composición que comprende el ARNsi o el vector de expresión de ARNsi como un constituyente activo puede comprender un constituyente arbitrario, tal como un tampón y/o adyuvante, que se conoce por los expertos en la técnica, de acuerdo con un objeto o los constituyentes de la composición.

- 30 La composición médica de acuerdo con la presente invención tiene preferentemente una forma tal que la composición pueda existir en una alta concentración en la sangre. Es decir, la composición médica tiene preferentemente una "forma inyectable", que es apropiada para una inyección en una vena, un músculo, una cavidad abdominal, un esternón y una articulación, y para una inyección subcutánea. Sin embargo, esta no es la única posibilidad. Por ejemplo, la composición médica puede ser un agente oral, tal como un comprimido, una cápsula (incluyendo una cápsula blanda y una microcápsula, siendo preferentemente una cápsula de liberación prolongada), una medicina en polvo, gránulos y un jarabe, o puede ser un agente parenteral, tal como una inyección, un supositorio, una pastilla y gotas. La composición médica de acuerdo con la presente invención puede administrarse por vía oral y parenteral debido a su baja toxicidad. Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, el término "parenteral" representa un tipo de administración, que incluye una inyección y una infusión en una vena, un músculo, una cavidad abdominal, un esternón, una articulación y una inyección e infusión subcutánea.

- 40 La composición médica de acuerdo con la presente invención puede administrarse en una ruta apropiada de acuerdo con su forma farmacéutica. El procedimiento para su administración no está particularmente limitado, y puede realizarse interna y externamente, y también puede realizarse por inyección. La solución de inyección puede administrarse en una vena y un músculo, y puede administrarse por vía intradérmica y subcutánea.

- 45 La composición médica de acuerdo con la presente invención puede producirse mediante un procedimiento conocido en el campo farmacéutico. La cantidad del ARNsi de 17AA en la composición médica de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitada, con la condición de que el ARNsi de 17AA se administre, teniendo en cuenta la forma y el procedimiento de administración, dentro del intervalo que se ha mencionado anteriormente usando la composición médica de acuerdo con la presente invención.

- 55 Ha de tenerse en cuenta que, en general, una composición puede ser cualquier composición que comprenda una sustancia A individualmente, una sola composición que comprenda la sustancia A y una sustancia B, y una combinación de una composición que comprenda la sustancia A individualmente y una composición que comprenda la sustancia B individualmente. Estas composiciones pueden comprender constituyentes (tales como un vehículo que puede estar aceptado como un agente farmacéutico) distintos de las sustancias A y B. Cuando la composición que comprende el ARNsi de 17AA(-) se usa junto con una composición que comprende otro constituyente (la sustancia B), estas composiciones no pueden considerarse como una composición en conjunto, ya que la composición médica de acuerdo con la presente invención está caracterizada porque comprende el ARNsi de 17A(-

), que se describe como la sustancia A. Sin embargo, una combinación de composiciones de este tipo puede considerarse como "kit", que se describirá en lo sucesivo en este documento. Se entenderá fácilmente por los expertos en la técnica que la combinación puede proporcionarse como un kit; no como una composición.

5 (2) Kit médico

La presente invención también proporciona un kit médico de acuerdo con las reivindicaciones que incluye el ARNsi de 17AA(-). Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, el término "kit" se refiere a un paquete que incluye un recipiente (tal como una botella, una placa, un tubo y un plato) para contener un material determinado en el mismo. Es preferible que el kit tenga instrucciones para el uso del material. Cuando se use para hacer referencia al kit en la presente memoria descriptiva, la expresión "que incluye" se refiere al contenido en uno de los recipientes individuales que constituyen el kit. El kit médico de acuerdo con la presente invención puede ser un paquete para empacar varias composiciones diferentes juntas. La composición tiene cualquiera de las formas que se han descrito anteriormente, y puede estar contenida en el recipiente cuando se encuentra en forma de solución. El kit médico de acuerdo con la presente invención puede incluir las sustancias A y B en un recipiente o en recipientes separados. Las "instrucciones" pueden tener cualquier forma que esté impresa "o" escrita en un papel o en cualquier otro medio, o pueden estar grabadas en un medio electrónico, tal como una cinta magnética, un disco o cinta legible por ordenador y un CD-ROM. Además, el kit médico de acuerdo con la presente invención puede incluir un recipiente que contiene un diluyente, un disolvente, un líquido de lavado u otros reactivos. Además, el kit médico de acuerdo con la presente invención puede incluir cualquier instrumento necesario para la aplicación del kit a un procedimiento para un tratamiento médico.

Los expertos en la técnica, que lean la presente memoria descriptiva, comprenderán fácilmente que el ARNsi de 17AA(-) y otras sustancias en el kit médico de acuerdo con la presente invención pueden usarse de acuerdo con la forma de uso de la composición.

(3) Procedimiento para un tratamiento médico

Además, se describe un procedimiento para un tratamiento médico que no forma parte de la presente invención. El procedimiento incluye una etapa de administración del compuesto de acuerdo con la presente invención a un sujeto.

Los expertos en la técnica, que lean la presente memoria descriptiva, entenderán fácilmente que el ARNsi de 17AA(-) y otras sustancias en el procedimiento pueden usarse de acuerdo con la forma de uso de la composición.

Ya que el gen WT1 se expresa altamente en una célula cancerosa, una muerte celular inducida por la supresión de la expresión de la isoforma 17AA(-) tiene lugar específicamente en la célula cancerosa, y no en una célula normal. Por lo tanto, es posible realizar una terapia de alcance molecular específica de las células cancerosas usando la presente invención.

En la presente memoria descriptiva, el tratamiento del tumor sólido se toma como un ejemplo del uso del ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-). A la luz del hecho de que el ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-) induce la apoptosis en una célula formadora del tumor sólido, los expertos en la técnica, que lean la presente memoria descriptiva, entenderán fácilmente que también se describe un agente inductor de muerte celular para inducir la apoptosis en la célula formadora del tumor sólido, un kit para inducir la muerte celular, y un procedimiento para inducir la muerte celular.

Ejemplo

[Materiales y procedimientos]

50

[1. Cultivo celular]

Se usaron en el experimento líneas de células humanas cancerosas (células de cáncer de ovario (células TYK-nu.CP-r (en lo sucesivo denominadas como células TYK), células de cáncer de estómago (células MKN28), células de cáncer de mama (células ZR-75 y células SKBr3), células de cáncer de esófago (células TE10), células de cáncer de páncreas (células MiaPaCa2), células de cáncer de colon (células SW480 y células de cáncer cervical (células HelaAG)), y líneas celulares humanas de fibrosarcoma (células HT-1080). Las células TE10 y las células SW480 se cultivaron en un medio RPMI-1640 complementado por suero bovino fetal al 10 % (FBS). Se cultivaron otras líneas celulares en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que incluye FBS al 10 %.

[2. Construcción del vector]

Se construyó pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) que incluía una de las cuatro isoformas de
 5 WT1 humano para su uso para la expresión de las isoformas WT1 en una célula TYK. Cada secuencia de las
 isoformas WT1, clonadas en un vector pUC19, se amplificó por PCR usando Pfx Taq polimerasa (Invitrogen), y
 después se insertaron en un vector pEGFP (Clontech, PaloAlto, CA, Estados Unidos) para usarse para una
 expresión transitoria de una isoforma WT1 marcada con la proteína verde fluorescente (GFP). Se determinó
 mediante un procedimiento de secuenciación directa usando el kit de secuenciación por ciclos BigDye Terminator
 10 V1.1 (Applied Biosystems, Branchberg, NI, Estados Unidos) que todas las secuencias amplificadas por PCR no
 tenían ninguna mutación.

Con el fin de preparar vectores para expresar α -actinina y cofilina, se preparó ADNc a partir de ARNm aislado de
 una célula TYK, y después se amplificaron secuencias de genes codificantes de α -actinina y cofilina mediante PCR
 15 con Pfx Taq polimerasa. Las secuencias codificantes de α -actinina y cofilina se insertaron en un vector
 pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen).

Con el fin de preparar un vector de ARNsi dirigido a gelsolina, se sintetizaron y se hibridaron un par de secuencias
 de ADN dirigidas a una secuencia de ARNm de gelsolina (5'-UCCAGGAUGAAGCAGUCGCCAUUGUUGAA-3': SEQ
 20 ID NO: 25) se sintetizaron (Japan BioScience, Saitama, Japón), y después se insertaron en piGENE tRNA Pur
 (Clontech), que es un vector de expresión de ARNt-ARNhp.

[3. Expresión constitutiva del vector]

25 Un vector de expresión mamífero y un vector ARNsi dirigido a gelsolina se linealizaron por PvuI, y después se
 transdujeron en células mediante electroporación usando Gene Pulsor II (Bio-Rad, CA, Estados Unidos). Los clones
 celulares que expresan de forma estable el vector de ARNsi se aislaron usando un antibiótico adecuado para la
 selección.

30 [Expresión transitoria del vector]

Usando Fugene 6 (Roche, Indianápolis, IN, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el
 fabricante, el ADN vectorial (2 μ g) se transfectó en células a una densidad celular de 5×10^4 células/ml. Las células
 transfectadas con el ADN vectorial se recogieron en el momento indicado para someterlas a análisis.

35

[PCR de transcripción inversa]

El ARN total se aisló usando ISOGEN (Nippon Gene, Tokio, Japón), y después se disolvió en agua tratada con
 pirocarbonato de dietilo (DEPC). El ARN total (2 μ g) se convirtió en ADNc usando transcriptasa inversa del virus de
 40 la leucemia murina de Moloney (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).

Las secuencias cebadoras y las condiciones de amplificación para someter once proteínas de unión a actina
 (incluyendo gelsolina, profilina, p125^{fa}, paxilina, α -actinina 1, VASP y gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa
 (GAPDH, usado como control)) a PCR se diseñaron de acuerdo con Salazar R. y col., Exp Cell Res; 249: 22 – 32
 45 (1999). Las secuencias cebadoras para el análisis por PCR de talina, cofilina, ezrina, radixina y moesina se
 muestran en la Tabla 1. Los productos de PCR se separaron sobre gel de agarosa al 2 % que incluía bromuro de
 etidio, y después se visualizaron mediante luz UV.

[Tabla 1]

	SECUENCIA CEBADORA (DIRECTA)	SECUENCIA CEBADORA (DE SENTIDO CONTRARIO)
GELSOLINA	CTT TCC AGC CAT ATC GCC ACC	TTC TCT GCC TCG CTG GCT C
PROFILINA	GGC CAG AAA TGT TCG GTG	ACG GGA GGG ATA TGG GTA
p125fak	GAC TCA CCT GGG TAC TGG TAT G	ATC GCT CTT CAC CTG TTG ATA G
PAXILINA	CAG TCG CCA AAG GAG TCT G	GTA GTC CTT GCG ACA GTA GGC
α -ACTININA 1	GGA GCC GAA GAA ATC GTG	CTG CTC GTT CTC CTG GTT G
VASP	GGA AAG TCA GCA AGC AGG	TGT GCG GAA AGG AGA AGC
TALINA	TGG CTA CCT GGA ACT GCT GGA C	TCC AGC TCT CGT TCC TTC CGA AG
COFILINA	AGT CTT CAA CGC CAG AGG AGG TG	GTG CAG CGG TCC TTG ACC TCC T
EZRINA	AGGAGTTGATGCTGCGGCTGCA	GTG GAT GAT GTC ATT GTG GGT C
RADIXINA	ACC ACC AGT CAT TCC TCC AAC AG	GGC AAG GTG GGA TGC ATT CCA TC
MOESINA	TGG TGC CTT CAA GAC CTT CAC C	GTC ACC TGA GAG GGT TGA GTA AAC
GAPDH	GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC	GTA GAG GCA GGG ATG ATG TTC

Con los pares de cebadores anteriores, los ARNm de las proteínas de unión a actina se amplificaron por PCR de transcripción inversa (20 ciclos, con una temperatura de hibridación de 60 °C).

5

[5. Transferencia Western]

Las células se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se disolvieron en un tampón de muestra SDS (que incluía Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), ditioneitol 100 mM, SDS al 4 %, sacarosa al 10 % y azul de bromofenol al 0,004 %). El lisado celular se sometió a SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno Immobilon (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). Después, el lisado celular se sometió a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de WT1 (Dakocytomation, Carpinteria, CA, Estados Unidos), GAPDH, actina (Chemicon, Temecula, CA, Estados Unidos), actina F (Abcam, Cambridge, Reino Unido), α -tubulina, cofilina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos), gelsolina (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos) y α -actinina 1 (clon AT6/172; Upstate Cell Signaling Solutions, Nueva York, NY, Estados Unidos), respectivamente.

15

[6. Inmunohistoquímica]

20 Las células casi confluentes se recogieron y se pusieron en placas a una densidad celular de 5×10^4 células/ml en 1 ml de DMEM que incluía FBS al 10 %, que se proporciona sobre una tapa de vidrio esterilizada (24 x 24 mm) colocada en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Después de incubarse durante una noche, las células sobre la tapa de vidrio se secaron al aire y después se fijaron con paraformaldehído (al 0,5 % (para la tinción de una fibra de estrés de actina), o al 4 % (para la tinción de otras proteínas)). Después, las células se lavaron dos veces con PBS 25 que incluía Tween 20 al 0,05 %, y posteriormente se hicieron permeables usando PBS que incluía Triton X-100 al 1 % (dejándolo durante 10 minutos). Las células se incubaron durante 30 minutos en tampón de bloqueo (PBS que incluía BSA al 2 %, Tween 20 al 0,2 %, glicerina al 6,7 % y NaN_3 al 0,1 %) y después se sometieron a inmunotransferencia con un anticuerpo primario específico de gelsolina, α -actinina 1 o cofilina mediante reacción durante una hora. Después de lavarse con PBS que incluía Tween 20 al 0,05 %, las células se incubaron durante 30 una hora con un anticuerpo secundario que corresponda al anticuerpo primario. Después, la fibra de estrés de actina y la vinculina (proteína de adhesión focal) se tiñeron con un kit de tinción FAK100 (Chemicon) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las expresiones de estas proteínas se analizaron usando un microscopio confocal (LSM510 ver. 2.8; Carl Zeiss, Alemania).

30

35 [7. Ensayo de unión celular y ensayo de desprendimiento celular]

Se realizó un ensayo de unión celular de acuerdo con Yu D. H. y col., J. Biol. Chem. 273: 21 125-131 (1998). El empobrecimiento del suero en DMEM que incluía FBS al 0,5 % se realizó durante una noche. Las células (1×10^4 células) se pusieron en placas a una densidad celular de 1×10^4 células/pocillo en 100 μ l del DMEM libre de suero 40 proporcionado en una placa de 96 pocillos que está recubierta con fibronectina (Sigma) a una concentración de 10

$\mu\text{g/ml}$, y después se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en presencia de CO_2 al 5 %. Después de lavarse dos veces con PBS, las células fijadas al pocillo se trataron con tripsina, y después se contó el número de células.

Se realizó un ensayo de desprendimiento celular de acuerdo con Grille S. J. y col., Cancer Res. 63: 2172-8 (2003).

- 5 Las células se colocaron en placas en 1 ml de DMEM que incluía FBS al 10 %, que se proporcionó en una placa de 24 pocillos, y después se incubaron durante una noche para que se fijaran al pocillo. Después, las células se trataron con tripsina al 0,25 % (Tecalai Tesque, Kyoto, Japón) a temperatura ambiente, y después se recogieron 2 minutos después del tratamiento con tripsina.

10 [8. Análisis del desplazamiento celular individual]

Se observó un desplazamiento celular individual usando un microscopio con lapso de tiempo. En resumen, las células se colocaron en placas sobre un plato de 35 mm con una confluencia del 30 %, y posteriormente se incubaron durante 48 horas. Después, las células se incubaron a 37 °C en presencia de O_2 al 5 %, CO_2 al 5 % y N_2 al 90 %, y se observaron durante 5 horas en intervalos de 2 minutos usando el software MetaCAM (Universal Imaging Software, Buckinghamshire, Reino Unido). Se determinaron las posiciones ([X, Y]) de las células, trazadas en un punto de tiempo determinado, usando el software Commotion Pro 4.0 (Pinnacle Systems, CA, Estados Unidos) a fin de que se calculara la distancia que se movía la célula cada 2 minutos. La velocidad ($\mu\text{m/h}$) de los desplazamientos de la célula que se trazó se determinó desde una distancia total de un desplazamiento de 5 horas.

20

[9. Ensayo de curación de herida]

Se realizó un ensayo de curación de herida de acuerdo con Stahle M. y col., J. Cell. Sci.; 116: 3835 – 46 (2003). En resumen, la suspensión celular (2×10^5 células/2 ml) se puso en placas a una densidad celular de 1×10^5 células/ml en 2 ml de DMEM que incluía FBS al 10 %, que se proporcionó en una placa de 6 pocillos, para crecer hasta confluir. Después, una monocapa de células confluentes se rayó con un chip de color amarillo para que las células rayadas se desprendieran. La monocapa celular restante se lavó dos veces moderadamente con DMEM libre de suero, y después se incubó en DMEM que incluía FBS al 10 %. Las imágenes de un sitio en el que se desprendieron las células se tomaron en el momento del raspado y 12 horas después del raspado. Se descubrió una migración celular como una relación media (porcentaje) de la longitud de la protrusión con respecto a la longitud del raspado en tres sitios diferentes en varios en lugares de una misma imagen.

30

[10. Ensayo de migración Transwell]

35 Se realizó un ensayo de invasión de quimiotaxis de acuerdo con Yoshioka K. y col., Proc Natl Acad Sci Estados Unidos; 100, 7247 – 52 (2003). Después de incubarse durante 2 horas en un DMEM libre de suero que incluía BSA al 0,1 %, las células (3×10^4 células) en 20 μl de DMEM libre de suero que incluía BSA al 0,1 % se aplicaron a una cámara superior del Transwell (membrana PET con un tamaño de poro de 8 μm ; BD Falcon, NJ, Estados Unidos). La cámara inferior se llenó con DMEM con suero al 5 % que incluía BSA al 0,1 %. Después de 18 horas, las células que se habían movido a la parte inferior de la membrana PET y la superficie inferior de un pocillo se inmovilizaron con metanol al 70 %, y se contó el número de las mismas.

40

[11. Transducción de ARNhp *in vivo*]

45 Las células de tumor humano HT-1080 (5×10^6 células) que expresaban WT1 se suspendieron en 100 μl de PBS. La suspensión se mezcló con 50 μl de matrigel (BD), y después se trasplantaron por vía subcutánea en un lado ventral de un ratón Balb/c nu/nu hembra de 6 semanas de edad. A partir de 3 días después del trasplante, se administró ARNhp de WT1 (50 μg) dirigido a la isoforma WT1 17AA(–), o un vector de control del ARNhp (50 μg), dos veces a la semana con anestesia, al sitio en el que se trasplantaron las células tumorales. El eje mayor y el eje menor de una masa tumoral en el sitio en el que se trasplantaron las células se midió 2 semanas después del trasplante. El volumen de la masa tumoral se definió como (eje mayor) x (eje menor) x (eje menor)/2.

50

[12. Análisis estadístico]

55 Se evaluó una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los grupos de ensayo usando una prueba t con datos independientes.

[13. Descripción de los dibujos]

Las figuras 1 son vistas que muestran un cambio morfológico de la célula TYK de cáncer de ovario inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 1(a) muestra, como ejemplo, los resultados de la transferencia Western que muestran la presencia o la ausencia de expresiones de las proteínas WT1 en cuatro líneas celulares TYK (estando cada una transducida con una de cuatro isoformas WT1 diferentes). La figura 1(b) muestra, como ejemplo, un cambio en la morfología celular provocado por expresiones estables de cada isoforma WT1 en la célula TYK. La figura 1(c) muestra los promedios de las áreas relativas de ocho o más células individuales obtenidas a partir de tres clones celulares. Las áreas se calcularon usando el software NIH Image.

Las figuras 2 son vistas que muestran un cambio morfológico de diversos tipos de células cancerosas inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 2(a) es una vista que muestra diversos tipos de células cancerosas (ZR-75, HT-1080, MKN28, SKBr3 y TE10, por ejemplo), en las que la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) marcada con GFP se expresó de forma transitoria. Las células se analizaron morfológicamente usando un microscopio confocal de 48 a 72 horas después de la transfección. Los paneles superiores son imágenes luminosas transmitidas; y los paneles inferiores son imágenes fluorescentes. Las flechas indican células que expresan la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) marcada con GFP. Las barras de escala son de 10 μm de largo. La figura 2(b) es una vista que muestra los promedios de las áreas relativas de más de nueve células individuales. Las áreas se calcularon usando el software NIH Image.

Las figuras 3 son vistas que muestran una supresión de la adhesión celular a un sustrato inducida por una expresión estable de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). El número medio de clones celulares TYK transducidos con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se representa por (■). El número medio de clones celulares transducidos con un vector de control se representa por (□). En la figura 3(a), las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK transducidas con el vector de control se analizaron con respecto a la adhesión celular a un sustrato usando un ensayo de unión celular. En la figura 3(b), las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK transducidas con un vector de control se analizaron con respecto a la resistencia de la adhesión celular a un sustrato usando un ensayo de desprendimiento celular.

Las figuras 4 son vistas que muestran una mejora del desplazamiento celular inducida por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). En la figura 4(a), los desplazamientos de las células TYK individuales que expresaban la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK individuales que no expresaban la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-) durante se grabaron durante 5 horas a intervalos de 2 minutos usando un grabador de vídeo con lapso de tiempo. Se calculó la velocidad de los desplazamientos de las células. La velocidad media de las células que expresaban la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-) se representa por (■). La velocidad media de las células que no expresan la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-) se representa por (□). El experimento se realizó diez veces por separado. En la figura 4(b), las células TYK (■) transducidas con un vector de expresión de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK (□) transducidas con un vector de control se analizaron con respecto a la migración colectiva usando un ensayo de curación de herida. Cada clon celular se aplicó tres veces por separado al experimento. Se descubrió la migración células como una relación promedio (porcentaje) de longitud de una protrusión con respecto a la anchura del desprendimiento celular realizan en primer lugar mediante un chip en tres sitios diferentes. Las barras de escala son de 50 μm de largo. En la figura 4(c), las células TYK (■) transducidas con un vector de expresión de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células TYK (□) transducidas con un vector de control se analizaron con respecto a la quimiotaxis hacia medio de Eagle modificado por Dulbecco que incluye FBS al 5 % usando un ensayo de migración Transwell. Cada clon celular se aplicó tres veces por separado. Las células que se desplazaron de una cámara superior a una cámara inferior se tiñeron con MayGrunwald-Giemsa, y se contó el número de las mismas. Las barras de escala son de 50 μm de largo.

Las figuras 5 son vistas que muestran un cambio de expresiones de la actina filamentosa (actina F) y las proteínas de unión a actina (ABP) inducido por una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 5(a) muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica para la actina F, la vinculina (proteína de adhesión focal) y los núcleos en una célula TYK transducida con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y una célula TYK transducida con un vector de control. Las barras de escala son de 10 μm de largo. En la figura 5(b), el lisado (hileras 1 y 2) de las células individuales transducidas con un vector de control y el lisado (hileras 3 y 4) de las células individuales transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de actina total, actina F, α -tubulina y GAPH, respectivamente. Las barras de escala son de 10 μm de largo. En la figura 5(c), las expresiones del ARNm en clones celulares TYK aislados individualmente (n = 3, hileras 1 a 3) transducidos con un vector de control y en clones celulares TYK aislados individualmente (n = 3, hileras 4 a 6) transducidos con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se analizaron por RT-PCR en una condición descrita en la Tabla 1. Las barras de escala son de 10 μm de largo. En la figura 5(d), los clones celulares TYK (hileras 1 y 2) transducidos con un vector de control y los clones celulares TYK (hileras 3 y 4) transducidos con la

isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de α -actinina 1, cofilina y gelsolina, respectivamente. En la figura 5(e), se realizó la tinción inmunohistoquímica para α -actinina 1, cofilina y gelsolina en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) o con un vector de control. Al mismo tiempo, los núcleos celulares se tificaron con yoduro de propidio. Las barras de escala son de 10 μ m de largo. En la figura 5(f), los clones celulares HT-1080 transducidos con un vector de control o con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de α -actinina 1, cofilina y gelsolina, respectivamente. En la figura 5(g), los clones celulares TE10 transducidos con un vector de control o con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos de α -actinina 1, cofilina y gelsolina, respectivamente.

10

Las figuras 6 son vistas que muestran que un fenotipo de una célula TYK en la que se inducen expresiones estables de α -actinina y cofilina mediante la transducción de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se restaura en un fenotipo que es su célula TYK precursora. Un vector de expresión de α -actinina y un vector de expresión de cofilina (TW/ACTN-CFL) o un vector de control se cotransfectaron en células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 6(a) muestra los niveles de expresión de la α -actinina y la cofilina, que se determinaron por transferencia Western. La figura 6(b) muestra las células teñidas con May Grunwald-Giemsa. La figura 6(c) muestra áreas celulares calculadas por el software NIH Image (1: clon celular TW/Mock; 2 y 3: clones celulares TW/ACTN-CFL diferentes, respectivamente). Las barras de escala son de 10 μ m de largo. Los resultados de las células TW/ACTN-CFL se representan por (■); y el resultado de las células TW/Mock se representa por (□). La figura 6(d) muestra una adhesión celular a un sustrato determinada por un ensayo de desprendimiento. El resultado de las células TW/ACTN-CFL se representa por (■); y el resultado de las células TW/Mock se representa por (□). La figura 6(e) muestra una migración celular colectiva analizada mediante un ensayo de curación de herida. La migración celular se representa como un promedio de la relación (porcentaje) de la longitud de la protrusión con respecto a la anchura del primer desprendimiento de células en tres sitios diferentes. El resultado de las células TW/ACTN-CFL se representa por (■); y el resultado de las células TW/Mock se representa por (□). La figura 6(f) muestra un nivel de expresión de gelsolina, que se determinó por transferencia Western.

Las figuras 7 son vistas que muestran que una supresión de la expresión de gelsolina redujo una migración celular, sin embargo, no afectó a la morfología celular ni a una adhesión celular a un sustrato. Un vector de ARNsi específico de gelsolina (TW/GSNsiRNA) o un vector de control (TW/siMock) se transdujo en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). La figura 7(a) muestra un nivel de expresión de la proteína gelsolina, que se determinó por transferencia Western. Se aplicaron tres clones celulares diferentes al experimento. La figura 7(b) muestra las células teñidas con May Grunwald-Giemsa. Las barras de escala son de 10 μ m de largo. La figura 7(c) muestra las áreas de los clones celulares TW/Mock y los clones celulares TW/GSNsiRNA, que se calcularon mediante el software NIH Image. El resultado de los clones celulares transducidos con el vector de ARNsi específico de gelsolina se representa por (■); y el resultado de los clones celulares transducidos con el vector de ARNsi Mock se representa por (□). La figura 7(d) muestra una adhesión celular a un sustrato determinada por un ensayo de desprendimiento. El resultado de los clones celulares transducidos con el vector de ARNsi específico de gelsolina se representa por (■); y el resultado de los clones celulares transducidos con el vector de ARNsi Mock se representa por (□). La figura 7(e) muestra un desplazamiento celular colectivo analizado por un ensayo de curación de herida. El resultado de los clones celulares transducidos con el vector de ARNsi específico de gelsolina se representa por (■); y el resultado de los clones celulares transducidos con el vector de ARNsi Mock se representa por (□). La figura 7(f) muestra los niveles de expresión de la α -actinina 1 y la cofilina, que se determinaron por transferencia Western.

La figura 8 es una vista que muestra una posibilidad de que la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) funcione controlando la dinámica citoesquelética. Una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) realiza una regulación por disminución de tanto la expresión de α -actinina 1 como de la expresión de cofilina, y una regulación por aumento de una expresión de gelsolina. Además, la α -actinina 1/cofilina y la gelsolina se regulan entre sí en la señalización en la dirección 3' de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Es decir, las funciones de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) (por ejemplo, inducción de un cambio morfológico en la célula, debilitamiento de la adhesión celular a un sustrato, mejora del desplazamiento celular) se realizan completa o parcialmente a través de regulaciones de la α -actinina 1/cofilina y la gelsolina.

[Ejemplo 1: Inducción del cambio morfológico en diversos tipos de células cancerosas por la expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-)]

Con el fin de examinar cómo afecta un gen WT1 a las acciones de una célula cancerosa uno cualquiera de cuatro genes WT1 se expresó de forma estable en células TYK de cáncer de ovario. Después, se aislaron los clones

celulares TYK en los que se expresó altamente la isoforma WT1 transducida (figura 1(a)). En la célula TYK, una expresión estable de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) indujo un cambio morfológico caracterizado por una morfología celular que tenía un pequeño tamaño y una forma similar a un fibroblasto (Figuras 1(b) y 1(c)). Por el contrario, las expresiones estables de las isoformas WT1 distintas de la isoforma 17AA(-)/KTS(-) no indujeron ningún cambio morfológico en la célula TYK.

Además, con el fin de examinar si la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) inducía un cambio morfológico en diversas células cancerosas distintas de la célula TYK, la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) marcada con GFP se expresó de forma transitoria en las células MKN28, las células ZR-75, las células SKBr3, las células TE10, las células MiaPaCa2, las células SW480, las células HelaAG y las células HT-1080 (figura 2). Los resultados de la microscopia confocal indicaron que la expresión transitoria de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) marcada con GFP indujo un cambio morfológico en las células MKN28, las células ZR-75, las células SKBr3, las células TE10 y las células HT-1080 en cuanto al tamaño celular (que es más pequeño) y la forma tridimensional de las células. Por otro lado, una expresión de un vector de control de GFP no indujo ningún cambio morfológico en estas líneas celulares. Las tres líneas celulares restantes (célula MiaPaCa2, célula SW480 y célula HelaAG) no mostraron claramente ningún cambio morfológico (no se muestran los datos).

Con el fin de verificar que únicamente la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) puede inducir el cambio morfológico en la célula cancerosa, una cualquiera de las otras tres isoformas WT1 marcadas con GFP se expresó de forma transitoria en las células HT-1080 y en las células TE10, cuyos cambios morfológicos se indujeron por la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Los resultados de la microscopia confocal indicaron que cualquiera de las tres isoformas WT1 marcadas con GFP no indujo ningún cambio morfológico en las dos líneas celulares (no se muestran los datos).

[Ejemplo 2: Supresión de la adhesión celular a un sustrato mediante la expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-)]

Con el fin de examinar si un cambio morfológico observado en una célula transducida con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se atribuyó a un cambio en la capacidad de extensión de la célula, se analizaron los efectos de una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) sobre la adhesión celular a un sustrato con respecto a las células TYK. Los resultados de un ensayo de unión celular indicaron que, en los clones celulares (n = 4) transducidos con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), la adhesión de las células a un sustrato se debilitó significativamente en comparación con los clones celulares (n = 4) transducidos con un vector Mock (figura 3(a)). Además, los resultados de un ensayo de desprendimiento celular indicaron que, en los clones celulares (n = 5) transducidos con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), la resistencia de la adhesión celular a un sustrato se redujo significativamente en comparación con los clones celulares (n = 5) transducidos con el vector Mock (figura 3(b)). En el ensayo de desprendimiento celular, el 53,3 % de las células transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se desprendió de un sustrato de plástico dos minutos después de un tratamiento con tripsina. Por otro lado, sólo el 9,8 % de las células transducidas con el vector de control se desprendió del sustrato. Es decir, la resistencia de la adhesión celular a un sustrato se redujo en la célula transducida con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), en comparación con la célula transducida con el vector de control.

[Ejemplo 3: Mejora en el desplazamiento celular mediante la expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-)]

Con el fin de examinar cómo afecta una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) a la migración celular, se analizaron las células transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) con respecto a la migración individual, la migración colectiva y una invasión in vitro.

Los desplazamientos de una célula TYK individual transducida con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se evaluaron usando un microscopio con lapso de tiempo (figura 4(a)). Las migraciones de la célula TYK individual se registraron en intervalos de 2 minutos durante 5 horas con (n = 19) o sin (n = 19) una expresión transitoria de la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-) en la célula. Después, los desplazamientos celulares se trazaron a fin de que se calculara la velocidad del desplazamiento celular. Los resultados del experimento que se realizó 10 veces por separado indicaron que la velocidad del desplazamiento aleatorio de las células TYK que expresaban la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-) aumentó 1,8 veces en comparación con las células que no expresaban la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-). Mientras tanto, las migraciones de la célula TYK individual que expresaba un vector GFP-mock no se diferenciaron significativamente de las de las células que no expresaban el vector GFP-mock (no se muestran los datos).

Con el fin de aclarar adicionalmente la mejora de la capacidad de desplazamiento de las células transducidas con la isoforma GFP-WT1 17AA(-)/KTS(-), se analizó una migración celular colectiva usando un ensayo de curación de herida (figura 4(b)). Se descubrió que la distancia que se movieron los clones celulares (n = 4) transducidos con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) durante 12 horas después de la herida aumentó 1,8 veces en comparación con las 5 células (n = 5) transducidas con un vector Mock.

Además, la invasión in vitro de los clones celulares transducidos con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se analizó usando un ensayo de migración Transwell (figura 4(c)). El número de células que entran en una membrana para invadirla se contó 18 horas después de poner en placas las células en una cámara superior. Se descubrió que la 10 quimiotaxis de los clones celulares (n = 4) transducidos con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) hacia FBS mejoró 8 veces en comparación con la de las células (n = 5) transducidas con el vector Mock.

[Ejemplo 4: Cambio en la expresión de actina filamentosa y la proteína de unión a actina mediante la expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-)]

15 En una célula TYK, una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) indujo un cambio morfológico en la célula, debilitó una adhesión celular a un sustrato y también mejoró un desplazamiento celular. Ya que estos resultados sugieren un cambio en la estructura citoesquelética, se realizó un análisis de los mismos en base a la inmunocitoquímica. Como se esperaba, en las células TYK se redujo una red de la actina filamentosa (actina F) y, 20 además, se redujo el desmosoma (figura 5(a)). Se indicó mediante transferencia Western que el nivel de expresión de actina F disminuyó en células transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) en comparación con las células transducidas con un vector Mock. Por otro lado, los niveles de expresión totales de actina y α -tubulina no se diferenciaron entre las células transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células transducidas con el vector Mock (figura 5(b)). En respuesta a estos resultados, las expresiones del ARNm que codificaban cada una de 25 las once proteínas de unión a actina (incluyendo α -actinina 1, cofilina, gelsolina, FAK, profilina, VASP, talina, ezrina, moesina y radixina) en las células transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se analizaron usando RT-PCR. Como se muestra en la figura 5(c), en las células transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se suprimieron las expresiones de la α -actinina 1 y la cofilina, y aumentó una expresión de gelsolina. Las expresiones reducidas de α -actinina 1 y cofilina, además del aumento de la expresión de gelsolina se confirmaron en el nivel de 30 proteínas mediante transferencia Western (figura 5(d)). Se indicó por inmunohistoquímica que, en el citoplasma de las células transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), se suprimieron las expresiones de la proteína α -actinina 1 y la proteína cofilina, y aumentó una expresión de gelsolina (figura 5 (e)). Las expresiones de ARNm que codificaba las ocho proteínas de unión a actina restantes no se diferenciaban entre las células transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y las células transducidas con el vector Mock (no se muestran los datos).

35 Además, con el fin de confirmar que la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) regula las expresiones de gelsolina, α -actinina 1 y cofilina, la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) se expresó de forma estable en una célula HT-1080 y una célula TE10. Como resultado de la transferencia Western, se indicó que, aunque las expresiones de α -actinina 1 y cofilina disminuyeron, las expresiones de gelsolina aumentaron en la célula transducida con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) en comparación con una célula transducida con un vector pcDNA 3.1/Zeo(+) de control (figuras 5(f) y 5(g)).

[Ejemplo 5: Restauración del fenotipo de las células transducidas con la isoforma WT-1 17AA(-)/KTS(-) mediante expresiones constitutivas de tanto α -actinina 1 como cofilina, o mediante la supresión de gelsolina con ARNs 45 específico de gelsolina]

Con el fin de determinar si una disminución de las expresiones de α -actinina 1 y cofilina provoca, en una célula TYK transducida con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), un cambio morfológico, una reducción del desmosoma, y una mejora en la migración celular, un vector α -actinina 1/pcDNA3.1/Zeo(+) y un vector cofilina/pcDNA3.1/Z(+) se co- 50 transdujeron en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Después, se aislaron los clones celulares (célula TW/ACTN-CFL) en los que la α -actinina 1 y la cofilina se expresaron en la misma medida que en una célula TYK precursora (figura 6(a)). Las características de las células TW/ACTN-CFL se compararon con las de las células TYK (TW/Mock) transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y con un vector pcDNA3.1/Zeo(+) de control. Como resultado, las células TW/ACTN-CFL mostraron cambios morfológicos con 55 respecto a la forma celular muy extendida similar a la célula TYK precursora. Por otro lado, las células TW/Mock no cambiaron de forma (figuras 6(b) y 6(c)). Se demostró mediante un ensayo de desprendimiento celular que el número de células desprendidas en los clones celulares TW/ACTN-CFL (n = 3) dos minutos después de un tratamiento con tripsina disminuyó en comparación con el número de las mismas en las células TW/Mock (n = 3)

para ser similar al número de las mismas en las células TYK precursoras (figura 6(d)). Además, se demostró mediante un ensayo de curación de herida que el desplazamiento celular de los clones celulares TW/ACTN-CFL (n = 3) se redujo en comparación con el de los clones celulares TW/Mock (n = 3) para ser similar al de las células TYK precursoras (figura 6(e)). Por el contrario, las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), en la que una de la cofilina y la α -actinina 1 se expresó de forma constitutiva, no presentaban las mismas características que las células TYK precursoras (no se muestran los datos). Esto demuestra que la α -actinina 1 y la cofilina actúan en incorporación en la regulación de la forma y la acción de las células TYK.

Con el fin de determinar si un aumento en el nivel de expresión de gelsolina afecta al cambio morfológico, el debilitamiento de la adhesión celular a un sustrato, y la mejora del desplazamiento celular en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-), un vector de ARNsi específico de gelsolina o un vector Mock se transdujo en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Después, se aislaron los clones celulares en los que se expresó gelsolina en una misma medida que en las células TYK precursoras (TW/GSNsiRNA) (n = 3) (figura 7(a)). Las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) en las que se suprimió una expresión de gelsolina por el vector de ARNsi específico de gelsolina no indujeron ningún cambio morfológico en las células TYK transducidas con la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) y con un vector de ARNsi Mock (TW/siMock) (n = 3) (figuras 7(b) y 7(c)). Los resultados de un ensayo de desprendimiento indicaron que las células TW/GSNsiRNA no se diferenciaban en la resistencia de una adhesión celular a un sustrato de las células TW/siMock (figura 7(d)). Mientras tanto, los resultados de un ensayo de curación de herida indicaron que se redujeron los desplazamientos celulares de las células TW/GSNsiRNA en comparación con los de las células TW/siMock, y disminuyeron extremadamente acompañados por la expresión suprimida de gelsolina para ser similares a una migración celular de las células TYK precursoras (figura 7(e)).

Además, con el fin de determinar cómo se correlacionan las expresiones de actinina/cofilina a las de gelsolina, se determinaron los niveles de expresión de la proteína gelsolina en células TW/ACTN-CFL y células TW/Mock. Como resultado, las expresiones constitutivas de α -actinina 1 y cofilina suprimieron la expresión de gelsolina (figura 6(f)). Por el contrario, una expresión suprimida de la gelsolina provocó un aumento en las expresiones de α -actinina 1 y cofilina (figura 7(f)).

En resumen, una expresión constitutiva de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) realiza una regulación por disminución de tanto la expresión de α -actinina 1 como de cofilina, y una por aumento de una expresión de gelsolina. Además, la expresión de α -actinina 1/cofilina y la expresión de gelsolina se regulan entre sí en la señalización en la dirección 3' de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-). Es decir, las funciones de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) (por ejemplo, la inducción de un cambio morfológico en la célula, el debilitamiento de la adhesión celular a un sustrato, la mejora de la migración celular) se realizan completa o parcialmente a través de las regulaciones de la α -actinina 1/cofilina y la gelsolina.

En base a los resultados anteriores, se descubrió que la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) cumple una función de oncogén en una célula formadora de un tumor sólido.

[Ejemplo 6: Inducción de la apoptosis en un tumor sólido mediante la supresión de la expresión de la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-)]

Se construyó un vector de ARNsi que suprime específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-). Concretamente, como se muestra en la figura 9, el ARNsi se construyó para dirigirse a una secuencia 5'-AGCCACCTTAAAGGGCCACAG-CACAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 26) en la isoforma WT1 17AA(-) a fin de que una región formada por el splicing de una región 17AA externa se convierta en una secuencia diana. Se sintetizó dicho oligo-ADN cuyos sitios de restricción se añadieron a ambos extremos de un oligonucleótido (SEQ ID NO: 27) compuesto por una hebra codificante (5'-agccaccuuuaaggccgcgguauagggua (una secuencia en la que una hebra codificante de la secuencia diana muta en una parte subrayada) -cttcctgtca (una secuencia bucle de pre-miR-23 humano) -uaccugugcuguggccuuuaagguggcu (una hebra no codificante de la secuencia diana)), y un oligo-ADN que es complementario al oligo-ADN anterior (Japan Bio Service). Después de una hibridación, estos oligo-ADN se insertan en un sitio en la dirección 3' de un promotor ARNt^{val} en el vector piGENEtrNA Pur (Clontech), obteniendo de este modo un vector de ARNsi de WRI-17AA(-) que transcribe ARNdh que incluye la secuencia de bucle.

Las líneas celulares que expresan WT1 (las células de fibrosarcoma HT-1080, las células de cáncer de estómago AZ-521 y las células de glioma A172) y una línea celular que no expresa WT1 (las células de cáncer de pulmón PC-14) se incubaron en presencia de CO₂ al 5 % a 37 °C en un medio DMEM que incluía FBS al 10 %.

Un vector de expresión de ARNsi de WT1 o un vector Mock (2 µg) se transdujo, mediante un procedimiento de lipofección usando FuGENE6 (Roche), en las células (con una cantidad de 2×10^5 células) que se colocaron en placas en una placa de 6 pocillos, y después se incubaron durante un día. Las células se trataron con tripsina tres días después de la transducción. Se contó el número de células, y después las células se sometieron a un análisis de citometría de flujo.

Después lavarse con PBS, las células con una cantidad de $1,0 \times 10^5$ se tiñeron mediante la reacción con Annexin V-FITC y PI a la temperatura ambiente durante 15 minutos con el uso de un kit de apoptosis MEBCYTO (Medical and Biological Laboratories CO., Ltd, Nagoya, Japón). Las células se analizaron usando un análisis de citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Una célula Annexin V-FITC positivo/PI negativo se consideró como una célula apoptótica.

En las células que expresan WT1 (la célula HT-1080, la célula AZ-521 y la célula A172), se indujo la apoptosis debido a la transducción de un vector WRI-17AA(-) específico de la isoforma WT1 17AA(-). Por otro lado, la apoptosis no se indujo en la línea celular PC-14 que no expresaba WT1, aunque se transdujo el WRI-17AA(-) (figura 10).

[Ejemplo 7: Supresión de la formación de un tumor sólido *in vivo* mediante la supresión de la isoforma WT1 17AA(-)]

La figura 11 muestra los tamaños de los tumores, formados por células HT-1080 inyectadas, en dos fuera de un grupo de ratones administrados con WT1-ARNhp (WRI) dirigido a la isoforma WT1 17AA(-) y en dos fuera de un grupo de ratones administrados con un vector de ARNhp de control (mock). Como se muestra en la figura 11, se suprimió *in vivo* un crecimiento tumoral mediante la supresión de una expresión de la isoforma WT1 17AA(-). Ha de observarse que el tamaño promedio en cada grupo se muestra en la figura 11.

Como se ha descrito anteriormente, mediante la aplicación del ARNsi que suprime específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) con respecto a una célula de tumor sólido en la que la isoforma WT1 17AA(-)/KTS(-) cumple una función como oncogén, puede inducirse una muerte celular que tiene lugar específicamente en la célula tumoral. Es decir, puede lograrse una función anticancerosa.

Mediante el uso de la presente invención, es posible inducir la apoptosis específicamente en una célula formadora de un tumor sólido. Por lo tanto, es posible tratar el tumor sólido.

Las realizaciones o ejemplos específicos puestos en práctica en la sección MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVECCIÓN Y EJEMPLO, únicamente muestran características técnicas de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Pueden realizarse variaciones dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

40 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Ya que un gen WT1 se expresa altamente de forma específica en una célula cancerosa, la muerte celular inducida por la supresión de una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) está provocada específicamente en la célula cancerosa, pero no en una célula normal. Por lo tanto, la presente invención es bastante útil en los campos de medicina y farmacia como una tecnología fundamental para el desarrollo de una terapia objetiva molecular específica para las células cancerosas.

LISTA DE SECUENCIAS

< 110 > INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.

< 120 > ARNsi específico de la isoforma WT1 17AA(-) y uso del mismo

< 130 > G20060108

55

< 140 > PCT/JP2007/056667

< 141 > 2007-03-28

< 150 > JP2006-092214

< 151 > 2006-03-29

< 160 > 39

5 < 170 > PatentIn Ver. 2.1

< 210 > 1

< 211 > 21

< 212 > ADN

10 < 213 > Secuencia Artificial

< 220 >

< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente

15 < 400 > 1

ctttccagcc atatcgcaa c 21

< 210 > 2

< 211 > 19

20 < 212 > ADN

< 213 > Secuencia Artificial

< 220 >

< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente

25 < 400 > 2

ttctctgcct cgctggctc 19

< 210 > 3

30 < 211 > 18

< 212 > ADN

< 213 > Secuencia Artificial

< 220 >

35 < 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente

< 400 > 3

ggccagaaat gttcggtg 18

40 < 210 > 4

< 211 > 18

< 212 > ADN

< 213 > Secuencia Artificial

45 < 220 >

< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente

< 400 > 4

acgggagga tatggta 18

50 < 210 > 5

< 211 > 22

< 212 > ADN

< 213 > Secuencia Artificial

55 < 220 >

< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente

< 400 > 5

	gactcacctg ggtactggta tg	22
	< 210 > 6	
	< 211 > 22	
5	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
10	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 6	
	atcgctcttc acctgttgat ag	22
	< 210 > 7	
15	< 211 > 19	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
20	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 7	
	cagtcgccaaggagtctg	19
25	< 210 > 8	
	< 211 > 21	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
30	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 8	
35	gtagtccttg cgacagtagg c	21
	< 210 > 9	
	< 211 > 18	
	< 212 > ADN	
40	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 9	
45	ggagccgaag aaatcgtg	18
	< 210 > 10	
	< 211 > 19	
	< 212 > ADN	
50	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
55	< 400 > 10	
	ctgctcgctc tcctgggtg	19
	< 210 > 11	
	< 211 > 18	

	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
5	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 11	
	ggaaagtcag caagcagg	18
10	< 210 > 12	
	< 211 > 18	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
15	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 12	
	tgtgcggaaa ggagaagc	18
20	< 210 > 13	
	< 211 > 22	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
25	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 13	
30	tggctacctg gaactgctgg ac	22
	< 210 > 14	
	< 211 > 23	
	< 212 > ADN	
35	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
40	< 400 > 14	
	tccagctctc gttcctccg aag	23
	< 210 > 15	
	< 211 > 23	
45	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
50	< 400 > 15	
	agtcttcaac gccagaggag gtg	23
	< 210 > 16	
55	< 211 > 22	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	

	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 16	
5	gtgcagcggg ccttgacctc ct	22
	< 210 > 17	
	< 211 > 22	
	< 212 > ADN	
10	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 17	
15	aggagttgat gctgoggctg ca	22
	< 210 > 18	
	< 211 > 22	
	< 212 > ADN	
20	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
25	< 400 > 18	
	gtggatgatg tcattgtggg tc	22
	< 210 > 19	
	< 211 > 23	
30	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
35	< 400 > 19	
	accaccagtc attctccaa cag	23
	< 210 > 20	
40	< 211 > 23	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
45	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 20	
	ggcaaggtgg gatgcattcc atc	23
50	< 210 > 21	
	< 211 > 22	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
55	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 21	
	tggtgccttc aagacctca cc	22

	< 210 > 22	
	< 211 > 24	
	< 212 > ADN	
5	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
10	< 400 > 22	
	gtcacctgag agggttgagt aaac	24
	< 210 > 23	
	< 211 > 20	
15	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
20	< 400 > 23	
	gccaaaaggg tcatcatctc	20
	< 210 > 24	
25	< 211 > 21	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
30	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 24	
	gtagaggcag ggatgatgtt c	21
35	< 210 > 25	
	< 211 > 29	
	< 212 > ARN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
40	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ARN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 25	
	uccaggauga agcagucgcc auuguugaa	29
45	< 210 > 26	
	< 211 > 30	
	< 212 > ADN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
50	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 26	
55	agccacotta aaggccaca gcacaggta	30
	< 210 > 27	
	< 211 > 10	
	< 212 > ADN	

ES 2 387 999 T3

	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ADN Sintetizada Artificialmente	
5	< 400 > 27	
	aagggccaca	10
	< 210 > 28	
10	< 211 > 70	
	< 212 > ARN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
15	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ARN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 28	
	agccaccuua aagggccgcg guauagggua cttcctgtca uaccugugc uguggccuu	60
	uaagguggcu	70
20	< 210 > 29	
	< 211 > 30	
	< 212 > ARN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
25	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ARN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 29	
30	agccaccuua aagggccgcg guauagggua	30
	< 210 > 30	
	< 211 > 30	
	< 212 > ARN	
	< 213 > Secuencia Artificial	
35	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ARN Sintetizada Artificialmente	
	< 400 > 30	
40	uaccugugc uguggccuu uaagguggcu	30
	< 210 > 31	
	< 211 > 10	
	< 212 > ARN	
45	< 213 > Secuencia Artificial	
	< 220 >	
	< 223 > Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de ARN Sintetizada Artificialmente	
50	< 400 > 31	
	cttctgtca	10
	< 210 > 32	
	< 211 > 3029	
55	< 212 > ADN	
	< 213 > humano	

< 400 > 32

ccaggcagct ggggtaagga gttcaaggca gcgccacac ccgggggctc tccgcaacc 60
gaccgcctgt ccgctcccc acttcccgc ctccctcca cctactcatt caccaccca 120
cccaccaga gccgggacgg cagcccaggc gccggggccc cgccgtctcc tgcgcgat 180
cctggacttc ctcttgctg aggaccggc ttccacgtgt gtcccggagc cggcgtctca 240
gcacacgctc cgctccgggc ctgggtgctt acagcagcca gagcagcagg gagtccggga 300
cccggcggc atctgggcca agttaggcgc gcgagggcc agcgctgaac gtctccaggg 360

ccggaggagc cgcggggcgt cgggtctga gccgcagcaa atgggctccg acgtgcggga 420
cctgaacgcg ctgctgcccg ccgtcccctc cctgggtggc ggccggcggc gtgccctgcc 480
tgtgagcggc gggcgcgagt gggcgccggt gctggacttt gcgccccgg gccttcggc 540
ttacgggtcg ttggggggcc cggcgccgcc accggctccg ccgccacccc cggcgccgcc 600
gcctcactcc ttcataaac aggagccgag ctggggcggc gggagccgc acgaggagca 660
gtgcctgagc gccttactg tccactttc cggccagttc actggcacag ccggagcctg 720
tcgctacggg cccttcggtc ctccctccgc cagccaggcg tcatccggcc aggccaggat 780
gtttcctaac gcgccctacc tgcacagctg cctcgagagc cagcccgcta ttcgcaatca 840
gggttacagc acggtcacct tcgacgggac gccagctac ggtcacacgc cctcgacca 900
tgcggcgagc ttcccaacc actcattcaa gcatgaggat cccatgggccc agcaggctc 960
gctgggtgag cagcagctc cgggtccgccc cgggtctat ggtgccaca ccccaccga 1020
cagctgcacc ggcagccagg ctttgctgct gaggacgccc tacagcagtg acaatttata 1080
ccaaatgaca tcccagctg aatgcatgac ctggaatcag atgaacttag gagccacctt 1140
aaaggagtt gctgctggga gctccagctc agtgaatgg acagaagggc agagcaacca 1200
cagcacaggg tacgagagcg ataaccacac aacgcccac ctctgaggag ccaatacag 1260
aatacacag cacgggtgct tcagaggcat tcaggatgtg cgacgtgtgc ctggagtagc 1320
cccactctt gtacggtcgg catctgagac cagtgagaaa cggcccttca tgtgtgctta 1380
cccaggctgc aataagagat attttaagct gtcccactta cagatgcaca gcaggaagca 1440
cactggtgag aaaccatacc agtgtgactt caaggactgt gaacgaaggt tttctcgttc 1500
agaccagctc aaaagacacc aaaggagaca tacaggtgtg aaaccattcc agtgtaaac 1560
ttgtcagcga aagtctccc ggtccgacca cctgaagacc cacaccagga ctatacagg 1620
taaaacaagt gaaaagccct tcagctgtcg gtggccaagt tgcagaaaa agtttgcccg 1680
gtcagatgaa ttagtccgcc atcacaacat gcatcagaga aacatgacca aactccagct 1740
ggcgcttga ggggtctccc tcggggaccg ttcagtgctc caggcagcac agtgtgtgaa 1800
ctgcttcaa gtctgactt cactcctcc tactaaaaa ggaaacttca gttgatcttc 1860
ttcatccaac ttccaagaca agataccggt gcttctggaa actaccaggt gtgcctggaa 1920
gagttggtct ctgccctgcc tacttttagt tgactcacag gccctggaga agcagctaac 1980
aatgtctggt tagttaaaag ccctttgcca tttgggtgtg attttctact gtaagaagag 2040
ccatagctga tcatgtccc ctgaccctc ccttctttt ttatgctcgt tttcgtcggg 2100
gatggaatta ttgtaccatt ttctatcatg gaatatttat aggccagggc atgtgtatgt 2160
gtctgctaat gtaaactttg tcatggtttc cacttactaa cagcaacagc aagaaataaa 2220
tcagagagca aggcacggg ggtgaatctt gtctaacatt cccgaggta gccaggctgc 2280
taacctgaa agcaggatgt agttctgcca ggcaactttt aaagctcatg catttcaagc 2340
agctgaagaa aaaatcagaa ctaaccagta cctctgtata gaaatctaaa agaattttac 2400
cattcagtta attcaatgtg aacactggca cactgctctt aagaaactat gaagatctga 2460
gattttttg tgtatgttt tgactctttt gagtggtaat catatgtgtc tttatagatg 2520
tacataacct cttgcacaaa tggaggggaa ttcattttca tcaactggag tgccttagt 2580
gtataaaaa catgctggta tatggcttca agttgtaaaa atgaaagtga ctttaaaaga 2640
aaatagggga tggccaggga tctccactga taagactgtt ttaagtaac ttaaggacct 2700
ttgggtctac aagtatatgt gaaaaaatg agacttactg ggtgaggaaa tccattgttt 2760
aaagatggtc gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 2820
ttttaaggga gggaatttat ttttaccgt tgcttgaat tactgtgtaa atatatgtct 2880
gataatgatt tgctcttga caactaaaat taggactgta taagtactag atgcatcact 2940
gggtgtgat cttacaagat attgatgata acacttaaaa ttgtaacctg catttttcac 3000
ttgtctca attaaagtct attcaaaag 3029

ES 2 387 999 T3

< 210 > 33
< 211 > 449
< 212 > PRT
5 < 213 > humano
< 400 > 33

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15
Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
20 25 30
Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45

ES 2 387 999 T3

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380

ES 2 387 999 T3

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
435 440 445

Leu

< 210 > 34

< 211 > 3020

5 < 212 > ADN

< 213 > humano

< 400 > 34

ccaggcagct ggggtaagga gttcaaggca ggcgccacac ccgggggctc tccgcaacc 60
gaccgcctgt ccgctcccc acttcccgcc ctccctccca cctactcatt caccacacca 120
cccaccaga gccgggacgg cagcccaggc gccggggccc gcctgtctcc togcccgat 180
cctggacttc ctcttgctgc aggaccggc ttccacgtgt gtcccgagc cggcgtctca 240
gcacacgctc cgctccgggc ctgggtgco acagcagcca gagcagcagg gactccggga 300
cccggggcgc atctgggcca agttaggcgc gcggaggcc agcgtgaac gtctccaggg 360
ccggaggagc cgcggggcgt ccgggtctga gccgcagcaa atgggctccg acgtgcggga 420
cctgaacgcg ctgctgccg ccgtccccct cctgggtggc ggccggcggt gtgccctgcc 480
tgtgagcggc gcggcgcagt gggcgcgggt gctggacttt gcgccccgg gcgcttcggc 540
ttacgggtcg ttgggcggcc ccgcgcggc accggctccg ccgccacccc cggccggcc 600
gcctcactcc ttcatcaaac aggagccgag ctggggcggc gcggagccgc acgagcgca 660
gtgcctgagc gccttactg tccactttc cggccagttc actggcacag ccggagcctg 720
tcgctacggg cccttcggtc ctccctcgcc cagccaggcg tcatccggcc aggccaggat 780
gtttcctaac gcgccctacc tgcccagctg cctcgagagc cagcccgtca ttgcaatca 840
gggttacagc acggtcacct tcgacgggac gccagctac ggtcacacgc cctcgcacca 900
tgccggcgcag ttcccccaacc actcattcaa gcatgaggat cccatgggccc agcagggctc 960
cgtgggtgag cagcagctact ccgtgcccgc cccggtctat ggctgccaca cccccata 1020
cagctgcacc ggccagcagg ctttgcctgt gaggacgccc tacagcagtg acaatttata 1080
ccaaatgaca tcccagcttg aatgcatgac ctggaatcag atgaaacttag gaccacctt 1140
aaagggagt gctgctggga gctccagctc agtgaatgg acagaagggc agagcaacca 1200
cagcacaggg tacgagagc ataaccacac aacgccatc ctctgoggag ccaatacag 1260
aatacacagc cacggtgtct tcagaggcat tcaggatgtg cgacgtgtgc ctggagtagc 1320
cccgactctt gtacggtcgg catctgagac cagtgaagaa cgcaccttca tgttgtctta 1380
cccaggctgc aataagagat attttaagct gtcccactta cagatgcaca gcaggaagca 1440
cactggtag aaaccatacc agtgtgactt caaggactgt gaacgaaggt tttctcttc 1500
agaccagctc aaaagacacc aaaggagaca tacagggtg aaaccattc agtgtaaaac 1560
ttgtcagcga aagttctccc ggtccgacca cctgaagacc cacaccagga ctatacagg 1620
tgaaaagccc ttcagctgtc ggtggccaag ttgtcagaaa aagtttgccc ggtcagatga 1680
attagtccgc catcacaaca tgcatcagag aaacatgacc aaactccagc tggcgctttg 1740
aggggtctcc ctccggggacc gttcagtgct ccaggcagca cagtgtgtga actgctttca 1800
agtctgactc tccactctc ctactaaaa aggaacttc agttgatctt ctatcatcca 1860
ctccaagac aagataccgg tgctctgga aactaccagg tgtgcttga agagtgtgtc 1920
ctgcccctgc ctacttttag ttgactaca ggccctggag aagcagctaa caatgtctgg 1980
ttagttaaa gccattgcc atttggtgtg gattttctac tgtaagaaga gccatagctg 2040
atcatgtccc cctgaccctt cccttcttt tttatgctc tttctgctg ggatggaatt 2100
attgtacat tttctatcat ggaatatta taggccagg catgtgtatg tctctgctaa 2160
tgtaaacttt gtcatggtt ccaattacta acagcaacag caagaaataa atcagagagc 2220
aaggcatcgg ggggtgaact tgtctaact tcccagggtc agccaggctg ctaacctgga 2280
aagcaggatg tagttctgcc aggcaacttt taaagctcat gcatttcaag cagctgaaga 2340

aaaaatcaga actaaccagt acctctgtat agaaatctaa aagaatttta ccattcagtt 2400
aattcaatgt gaacactggc acactgctct taagaaacta tgaagatctg agatTTTTT 2460
gtgtatgttt ttgactcttt tgagtggtaa tcatatgtgt ctttatagat gtacatacct 2520
ccttgacaaa atggagggga attcattttc atcactggga gtgtccttag tgtataaaaa 2580
ccatgctggt atatggcttc aagttgtaaa aatgaaagt actttaaaag aaaatagggg 2640
atggtccagg atcctcactg ataagactgt ttttaagtaa ctttaaggacc tttgggtcta 2700
caagtatatg tgaaaaaat gagacttact gggtagggaa atccattgtt taaagatggt 2760
cgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtttgt tttttaaggg 2820
agggaaatta ttatttaccg ttgcttgaaa ttactgtgta aatatatgtc tgataatgat 2880
ttgctctttg acaactaaaa ttaggactgt ataagtacta gatgcatcac tgggtgttga 2940
tcttacaaga tattgatgat aacacttaaa attgtaacct gcatttttca ctttgcctc 3000
aattaaagtc tattcaaaag 3020

< 210 > 35
< 211 > 446

ES 2 387 999 T3

< 212 > PRT
 < 213 > humano

< 400 > 35

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30
 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45
 Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220

ES 2 387 999 T3

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro
 405 410 415
 Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His
 420 425 430
 Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
 435 440 445

- < 210 > 36
- < 211 > 2978
- 5 < 212 > ADN
- < 213 > humano
- < 400 > 36

ccaggcagct ggggtaagga gttcaaggca ggcgccacac ccgggggctc tccgcaacc 60
gaccgcctgt ccgctcccc acttcccgcc ctccctcca cctactcatt caccacc 120
cccaccaga gccgggacgg cagcccaggc gcccgggccc cgccgtctcc tcgcccgat 180
cctggacttc ctcttgctgc aggaccggc ttccacgtgt gtcccgaggc cggcgtctca 240
gcacacgctc cgctccgggc ctgggtgcct acagcagcca gagcagcagg gactcggga 300
ccggggcggc atctgggcca agttaggcgc cgccgaggcc agcgtgaac gtctccagg 360
ccggaggagc cgcggggcgt ccgggtctga gccgcagcaa atgggctccg acgtgcggga 420
cctgaacgcg ctgctgccc cgtcccctc cctgggtggc ggcggcggtc gtgccctgcc 480
tgtgagcggc gggcgccagt gggcgccggt gctggacttt gcgccccgg gcgcttcggc 540
ttacgggtcg ttggggcgcc ccgcccggc accggctccg ccgcaccccc cggcgccgcc 600
gcctcactcc ttcataaac aggagccgag ctggggcggc gcggagccgc acgaggagca 660
gtgcctgagc gccttactg tccactttc cggccagttc actggcacag ccggagcctg 720
tcgctacggg cccttcggtc ctctccgcc cagccaggcg tcatccggc aggccaggat 780

gtttcctaac ggcocctacc tgcccagctg cctcgagagc cagcccgcta ttcgcaatca 840
gggttacagc acggtcacct tcgacgggac gccagctac ggtcacacgc cctcgacca 900
tgccggcgag tcccccaacc actcattcaa gcatgaggat cccatgggccc agcagggctc 960
gctgggtgag cagcagctact cgggtccgcc cccggcttat ggctgccaca cccccaccga 1020
cagctgcacc ggcagccagg ctttgctgct gaggacgccc tacagcagtg acaatttata 1080
ccaaatgaca tcccagctg aatgcatgac ctggaatcag atgaacttag gagccacctt 1140
aaaggccac agcacagggt acgagagcga taaccacaca acgcccattc tctgcccggc 1200
ccaatacaga atacacacgc acggtgtcct cagaggcatt caggatgtgc gactgtgccc 1260
tgagtagacc ccgactcttg tacggtcggc atctgagacc agtgagaaac gcccttcat 1320
gtgtgcttac ccaggctgca ataagagata ttttaagctg tcccacttac agatgcacag 1380
caggaagcac actggtgaga aaccatacca gtgtgacttc aaggactgtg aacgaaggtt 1440
ttctcgttca gaccagctca aaagacacca aaggagacat acagggtgga aaccattcca 1500
gtgtaaaact tgtcagcgaa agttctccc gtccgaccac ctgaagaccc acaccaggac 1560
tcataccagg aaaacaagtg aaaagccctt cagctgtcgg tggccaagtt gtcagaaaa 1620
gcttcccggg tcagatgaat tagtccgcca tcacaacatg catcagagaa acatgacca 1680
actccagctg gcgctttgag gggctcctc cggggaccgt tcagtgtccc aggcagaca 1740
gtgtgtgaac tgctttcaag tctgactctc cactcctcct cactaaaaag gaaacttcag 1800
ttgatcttct tcatccaact tccaagacaa gataccgggtg cttctggaaa ctaccagggtg 1860
tgccctggaag agttggctct tgccctgcct acttttagtt gactcacagg ccctggagaa 1920
gcagctaaca atgtctggtt agttaaagc ccattgccat ttgggtgga tttctactg 1980
taagaagagc catagctgat catgtcccc tgacccttcc cttcttttt tatgctcgtt 2040
ttcgttgggg atggaattat tgtaccattt tctatcatgg aatatttata ggcagggca 2100
tgtgtatgtg tctgctaag taaactttgt catggtttcc atttactaac agcaacagca 2160
agaaataaat cagagagcaa ggcacgggg gtgaatcttg tctaacttc ccgaggctcag 2220
ccaggctgct aacctggaaa gcaggatgta gttctgccag gcaactttta aagctcatgc 2280
atttcaagca gctgaagaaa aaatcagaac taaccagtac ctctgtatag aaatctaaa 2340
gaattttacc attcagttaa ttcaatgtga acactggcac actgctctta agaaactatg 2400
aagatctgag attttttgt gtatgtttt gactctttt agtggtaatc atatgtgtct 2460
ttatagatgt acatacctcc ttgcacaaat ggaggggaa tcattttcat cactgggagt 2520
gtccttagtg tataaaaacc atgctggtat atggcttcaa gttgtaaaaa tgaaagtgc 2580
tttaaaagaa aataggggat ggtccaggat ctccactgat aagactgttt ttaagtaact 2640
taaggacctt tgggtctaca agtatatgtg tttggtgtg gacttactgg gtgaggaaat 2700
ccattgttta aagatggtcg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 2760
tgttttgttt tttaaggag ggaatttatt attaccgtt gcttgaat actgtgtaaa 2820
tatagtctg ataatgatt gctctttgac aactaaaatt aggactgtat aagtactaga 2880
tgcatcactg ggtgttgatc ttacaagata ttgatgataa cacttaaaat tgtaacctgc 2940
attttcaact ttgctctcaa ttaaagtcta ttcaaaag 2978

ES 2 387 999 T3

< 211 > 432
< 212 > PRT
< 213 > humano

5 < 400 > 37

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15
Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
20 25 30
Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45
Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
50 55 60
Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
65 70 75 80
Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser
 245 250 255

Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His
 260 265 270

Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly
 275 280 285

Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg
 290 295 300

Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu
 305 310 315 320

Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr
 325 330 335

Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln
 340 345 350

Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys
 355 360 365

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His
 370 375 380

Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg
 385 390 395 400

Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
 405 410 415

His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu

< 210 > 38
< 211 > 2969
< 212 > ADN
5 < 213 > humano

< 400 > 38

ccaggcagct ggggtaagga gttcaaggca ggcgccacac ccgggggctc tccgcaacc 60
 gaccgcctgt ccgctcccc acttcccgcc ctccctccca cctactcatt caccacacca 120
 cccaccaga gccgggacgg cagcccaggc gcccgggccc cgccgtctcc tcgcccgat 180
 cctggacttc ctcttctgc aggaccggc ttccactgtt gtcccggagc cggcgtctca 240
 gcacacgctc cgctccgggc ctgggtgcct acagcagcca gagcagcagg gactccggga 300
 cccggcgggc atctgggcca agttaggcgc cgccgaggcc agcgcgtgaac gtctccaggg 360
 ccggaggagc cgcggggcgt ccgggtctga gccgcagcaa atgggctccg acgtcgggga 420
 cctgaacgcg ctgctgcccg ccgtcccctc cctgggtggc ggcggcggct gtgccctgcc 480
 tgtgagcggc gcggcgcagt gggcgcgggt gctggacttt gcgccccgg gccttcggc 540
 ttacgggtcg ttggcgggcc ccgcccggc accggctccg ccgccacccc cgcggcggc 600
 gcctcactcc ttcatcaaac aggagccgag ctggggcggc gcggagccgc acgaggagca 660
 gtgcctgagc gccttactg tccacttttc cggccagttc actggcacag ccggagcctg 720
 tcgctacggg cccttcggtc ctctccggc cagccaggcg tcatccggcc aggccaggat 780
 gtttctaac gcgccctacc tgcccagctg cctcgagagc cagcccgcta ttcgcaatca 840
 gggttacagc acggtcacct tcgacgggac gccagctac ggtcacacgc cctcgacca 900
 tgcggcgag ttcccaaac actcattcaa gcatgaggat cccatgggcc agcagggctc 960
 gctgggtgag cagcagact cgggtccgcc cccggcttat ggctgccaca cccccaccga 1020
 cagctgcacc ggcagccagg ctttgcctgt gaggacgccc tacagcagt acaatttata 1080
 ccaaatgaca tcccagctg aatgcatgac ctggaatcag atgaacttag gaggccactt 1140
 aaaggccac agcacagggt acgagagcga taaccacaca acgcccattc tctcgggagc 1200
 caatacaga atacacacgc acgggtctct cagaggcatt caggatgtgc gactgtgctc 1260
 tggagtagcc ccgactcttg tacggtcggc atctgagacc agtgagaaac gcccttcat 1320
 gtgtgcttac ccaggctgca ataagagata ttttaagctg tcccacttac agatgcacag 1380
 caggaagcac actggtgaga aaccatacca gtgtgacttc aaggactgtg aacgaaggtt 1440
 ttctcgttca gaccagctca aaagacacca aaggagacat acagggtgta aaccattcca 1500
 gtgtaaaact tgtcagcga agttctccc gtcggaccac ctgaagacc acaccaggac 1560
 tcatacaggt gaaaagccct tcagctgtc gttggccaagt tgcagaaaa agtttggccg 1620
 gtcagatgaa ttagtccgcc atcacaacat gcatcagaga aacatgacca aactccagct 1680
 ggcgctttga tgggtctccc tcggggaccg ttcagtgcc caggcagcac agtggtgaa 1740
 ctgctttcaa gtctgactc ccactcctcc tcaactaaaa ggaaacttca gttgatcttc 1800
 ttcatccaac ttccaagaca agataccggt gcttctggaa actaccagggt gtgctggaa 1860
 gacttggtct ctgccctgcc tacttttagt tgactcacag gccctggaga agcagctaac 1920
 aatgtctggt tagttaaag cccattgcca tttggtgtgg attttctact gtaagaagag 1980
 ccatagctga tcatgtcccc ctgaccctc ccttctttt ttatgctcgt ttcgctggg 2040
 gatggaatta ttgtaccatt ttctatcatg gaatatttat aggccagggc atgtgtatgt 2100
 gtctgctaata gtaactttg tcatggttc cacttactaa cagcaacagc aagaaataaa 2160
 tcagagagca aggcacggg ggtgaatctt gtctaacttt cccgaggta gccaggctgc 2220
 taacctggaa agcaggatgt agttctgcca ggcaactttt aaagctcatg cattcaagc 2280
 agctgaagaa aaaatcagaa ctaaccagta cctctgtata gaaatctaaa agaattttac 2340
 cattcagtta attcaatgtg aacactggca cactgctctt aagaaactat gaagatctga 2400
 gattttttg tgtatgttt tgactcttt gagtggtaat catatgtgtc ttatagatg 2460
 tacatactc cttgcacaaa tggaggggaa ttcattttca tcaactggag tgctcttagt 2520
 gtataaaaac catgctggtat tatggcttca agttgtaaaa atgaaagtga cttaaaaga 2580
 aaatagggga tggccagga tctccactga taagactgtt ttaagtaac ttaaggacct 2640
 ttgggtctac aagtatatgt gaaaaaatg agacttactg ggtgaggaaa tccattgttt 2700
 aaagatggtc gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtttgtt 2760
 ttttaagggg gggaaattat tattaccgt tcttgaat tactgtgtaa atatatgct 2820
 gataatgatt tgcctttga caactaaaat taggactgta taagtactag atgcatcact 2880
 ggggtgtgat cttacaagat attgatgata acacttaaaa ttgtaacctg cattttcac 2940
 tttgctctca attaaagtct attcaaaag 2960

- < 210 > 39
- < 211 > 429
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > humano

< 400 > 39

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30
 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45
 Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser
 245 250 255
 Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His
 260 265 270
 Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly
 275 280 285

ES 2 387 999 T3

Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg
 290 295 300

Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu
 305 310 315 320

Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr
 325 330 335

Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln
 340 345 350

Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys
 355 360 365

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His
 370 375 380

Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser
 385 390 395 400

Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn
 405 410 415

Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
 420 425

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido de 15 a 49 bases de longitud que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 27, donde el
5 polinucleótido puede proporcionar un ARNs que puede inhibir específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) sin inhibir una expresión de la isoforma WT1 17AA(+).
2. Un polinucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 26.
- 10 3. Una composición médica para tratar un tumor sólido, que comprende uno cualquiera de ARN de doble hélice, ADN que codifica el ARN de doble hélice; y un vector en el que se inserta el ADN, donde:

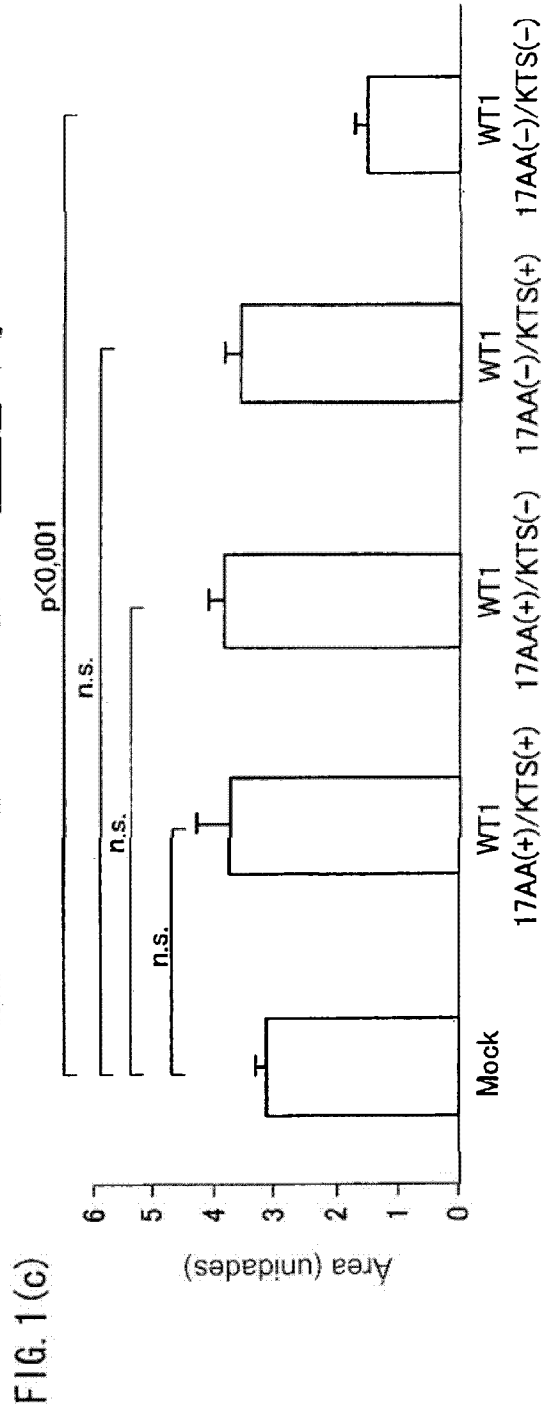
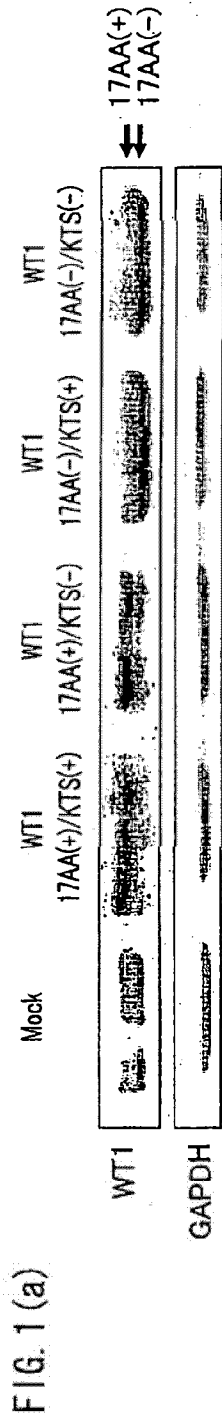
el ARN de doble hélice puede inhibir específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) sin inhibir una expresión de la isoforma WT1 17AA(+), y está compuesto por (i) un primer ARN y (ii) un segundo ARN capaz de
15 emparejarse con el primer ARN; donde el primer ARN es codificado por un ADN complementario a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 26 e incluye la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 27.
4. La composición médica de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ADN que codifica el segundo
20 ARN hibrida en una condición astringente con un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 26 y que incluye la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 27.
5. La composición médica de acuerdo con la reivindicación 3, donde el segundo ARN incluye al menos
25 15 bases contiguas en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 29.
6. La composición médica de acuerdo con la reivindicación 3, donde el primer ARN incluye al menos 15
bases contiguas en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 30.
7. La composición médica de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ADN que codifica el ARN de
30 doble hélice incluye la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 27.
8. La composición médica de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ARN de doble hélice está
compuesto por un emparejamiento de ARN que incluye la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 29 con ARN
incluyendo la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 30.
35
9. Un kit médico para tratar un tumor sólido, que comprende uno cualquiera de un ARN de doble hélice,
ADN que codifica el ARN de doble hélice; y un vector en el que se inserta el ADN, donde:

el ARN de doble hélice puede inhibir específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) sin inhibir una
40 expresión de la isoforma WT1 17AA(+), y está compuesto por (i) un primer ARN y (ii) un segundo ARN capaz de emparejarse con el primer ARN; donde el primer ARN está codificado por un ADN complementario a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 26 e incluye la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 27.
- 45 10. Uso de un ARN de doble hélice, ADN que codifica el ARN de doble hélice, o un vector en el que se inserta el ADN, para fabricar un medicamento para el tratamiento de un tumor sólido, donde:

el ARN de doble hélice puede inhibir específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) sin inhibir una
expresión de la isoforma WT1 17AA(+), y está compuesto por (i) un primer ARN y (ii) un segundo ARN capaz de
50 emparejarse con el primer ARN, donde el primer ARN está codificado por un ADN complementario a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 26 e incluye la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 27.
11. Un ARN de doble hélice que está compuesto por (i) un primer ARN y (ii) un segundo ARN capaz de
55 emparejarse con el primer ARN, donde:

el primer ARN está codificado por un ADN complementario a un polinucleótido que tiene al menos 15 bases contiguas en la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 26; y donde el polinucleótido incluye la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 27,

donde el ARN de doble hélice puede inhibir específicamente una expresión de la isoforma WT1 17AA(-) sin inhibir una expresión de la isoforma WT1 17AA(+).



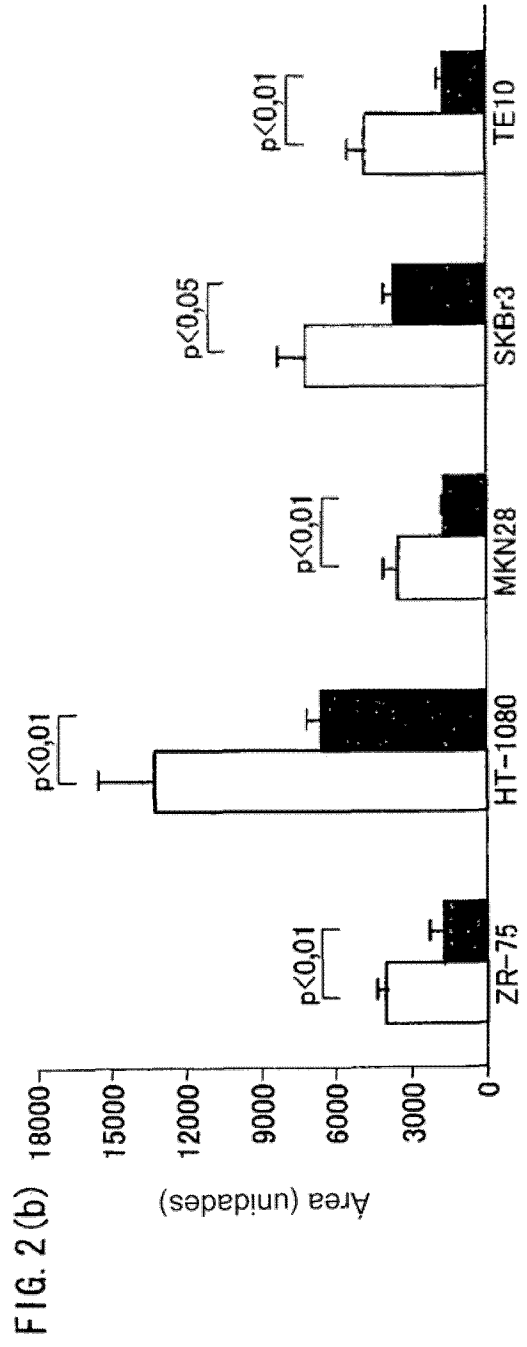
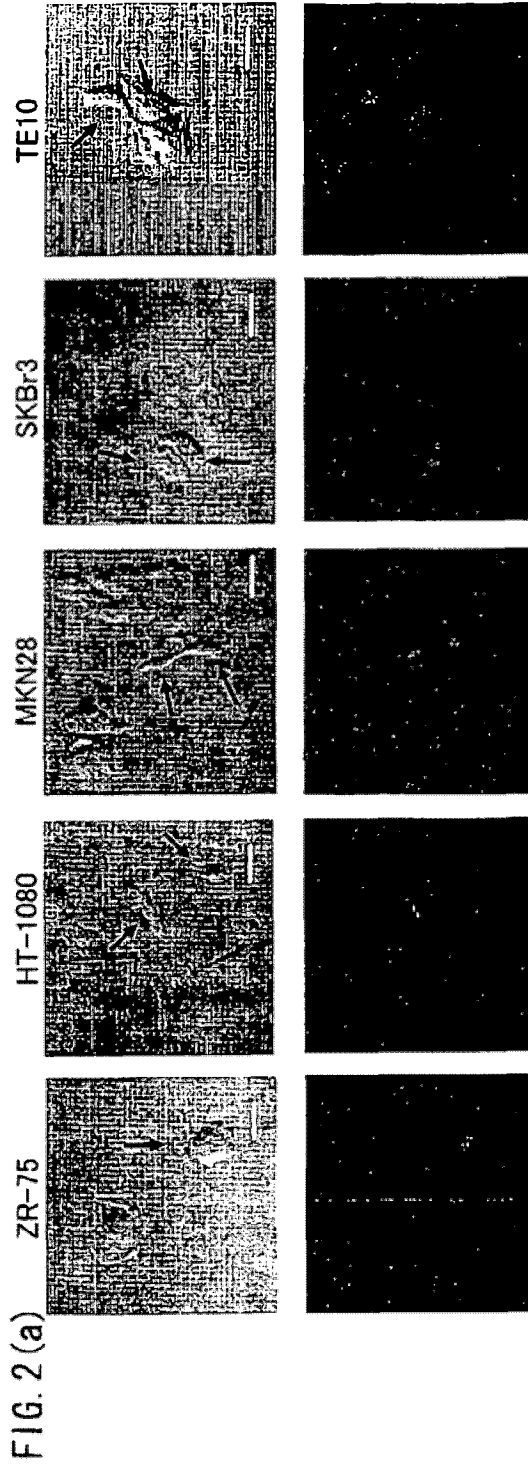


FIG. 3(b)

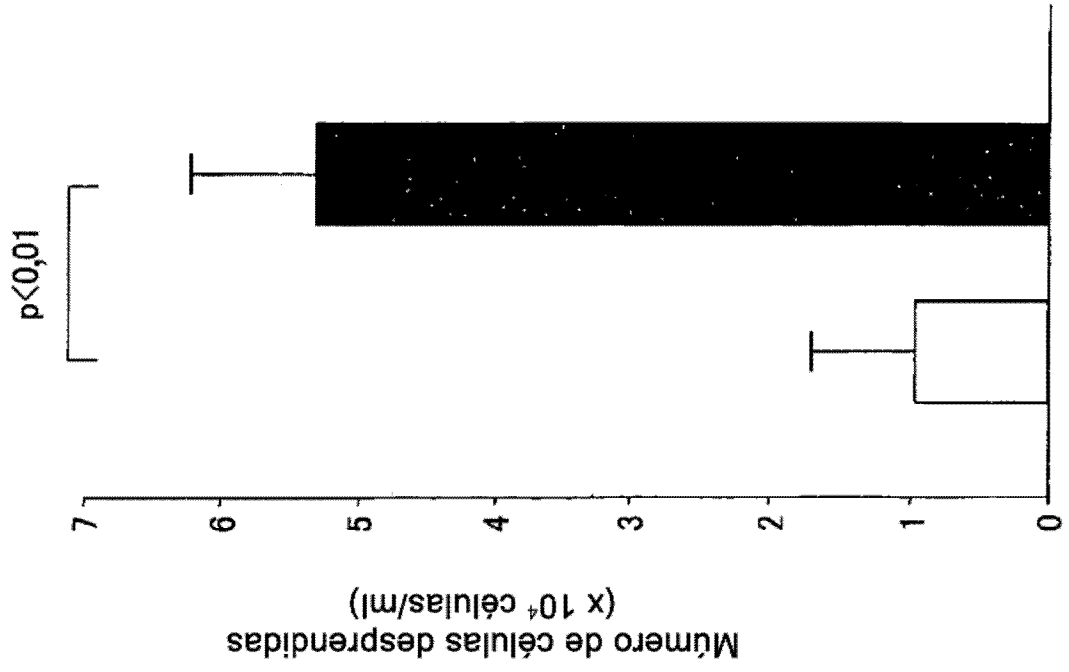


FIG. 3(a)

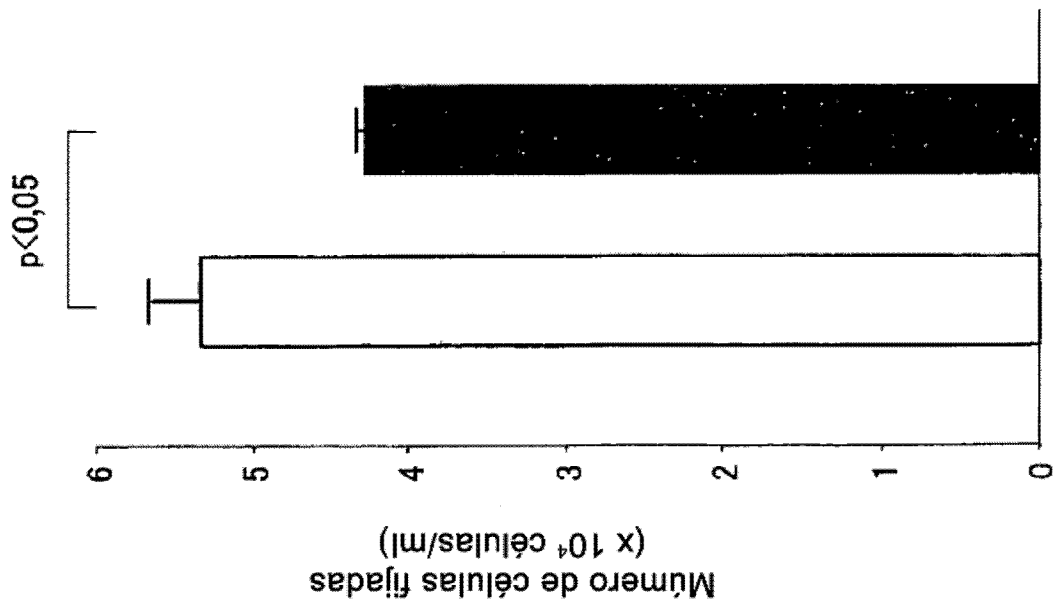


FIG. 4 (a)

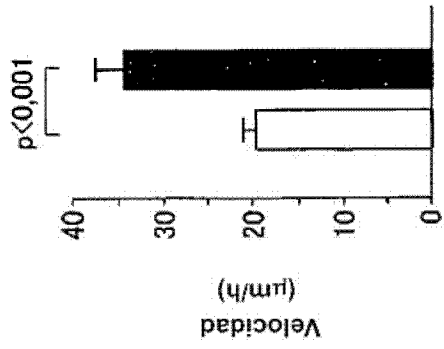


FIG. 4 (b)

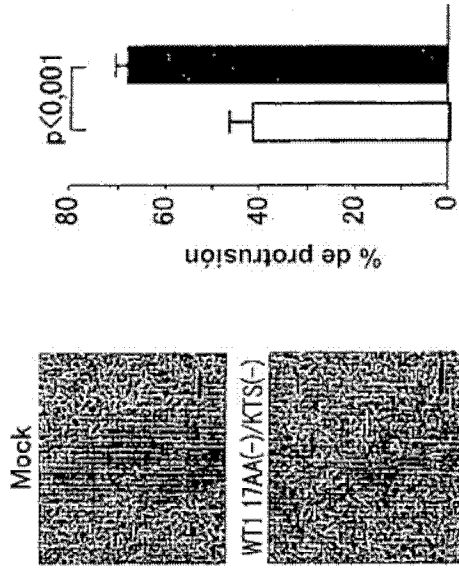


FIG. 4 (c)

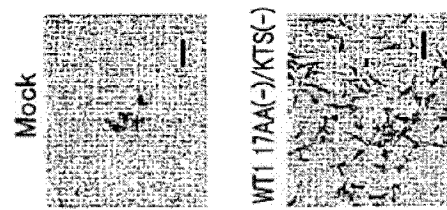


FIG. 5 (a)

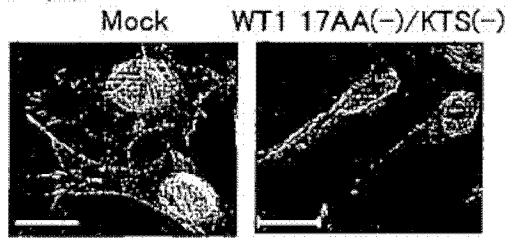


FIG. 5 (f)

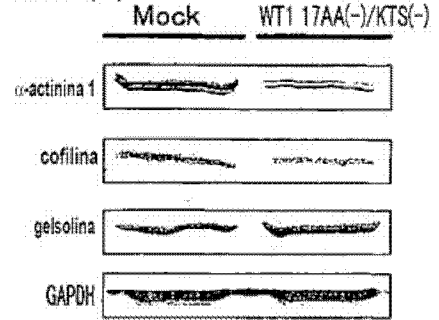


FIG. 5 (b)

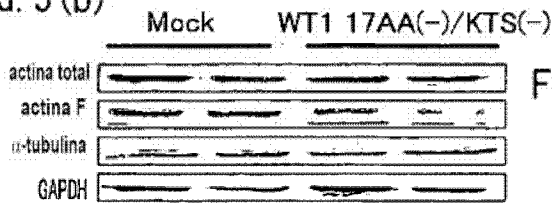


FIG. 5 (g)

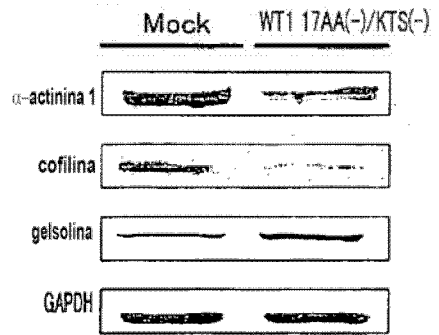


FIG. 5 (c)

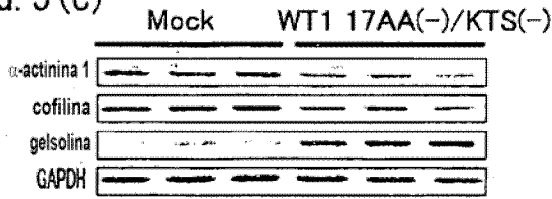


FIG. 5 (d)

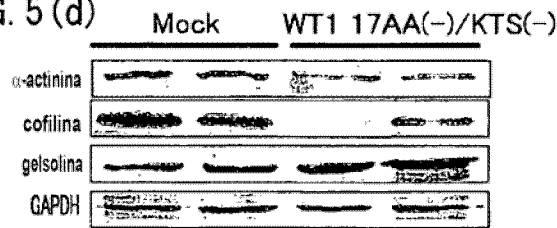


FIG. 5 (e)

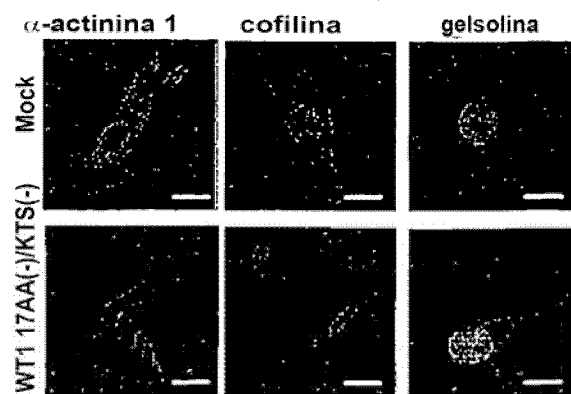


FIG. 6 (a)

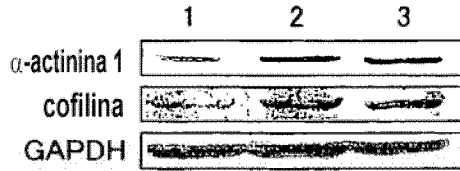


FIG. 6 (c)

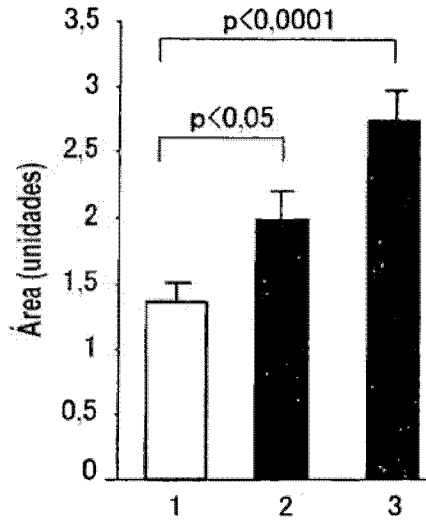


FIG. 6 (b)

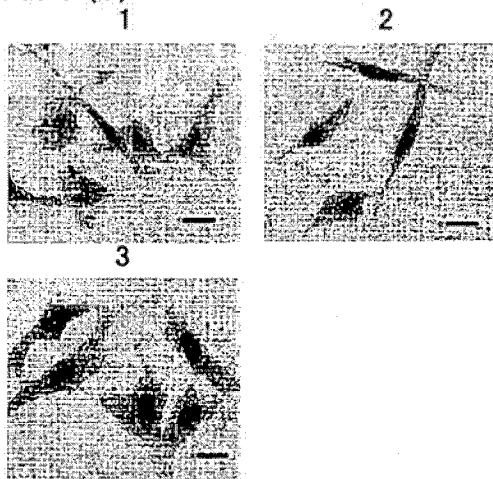


FIG. 6 (d)

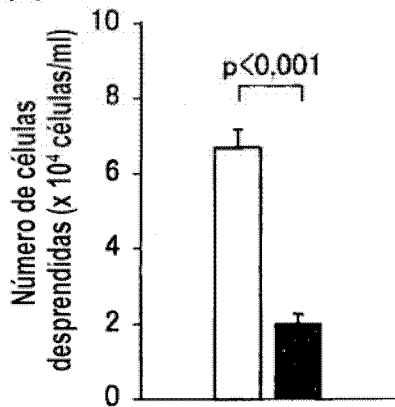


FIG. 6 (e)

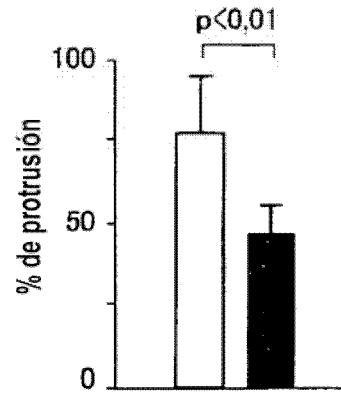
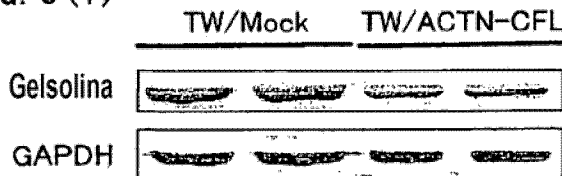


FIG. 6 (f)



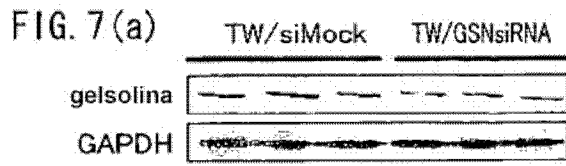


FIG. 7(c)

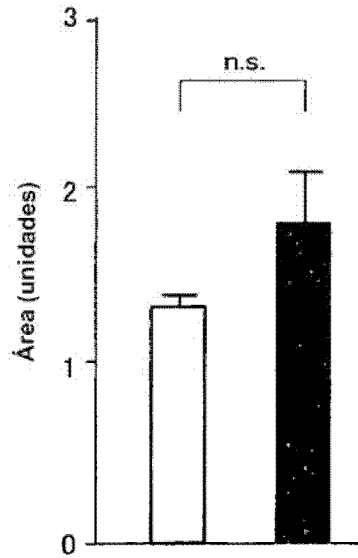


FIG. 7(b)

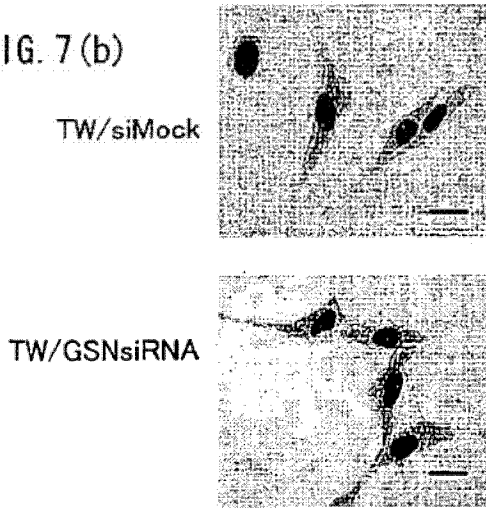


FIG. 7(d)

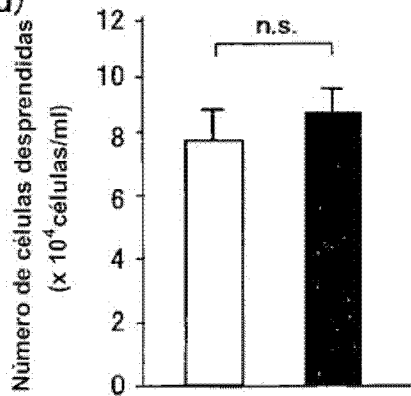


FIG. 7(e)

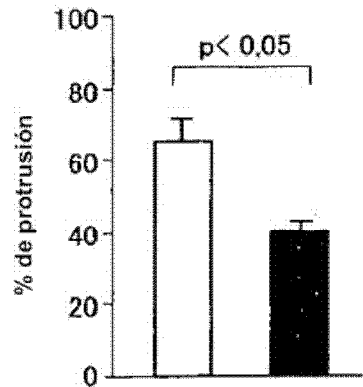


FIG. 7(f)

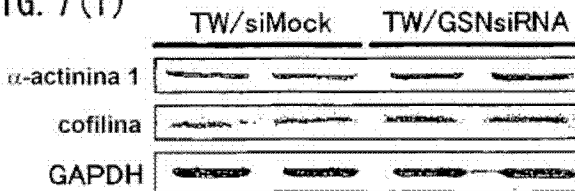


FIG. 8

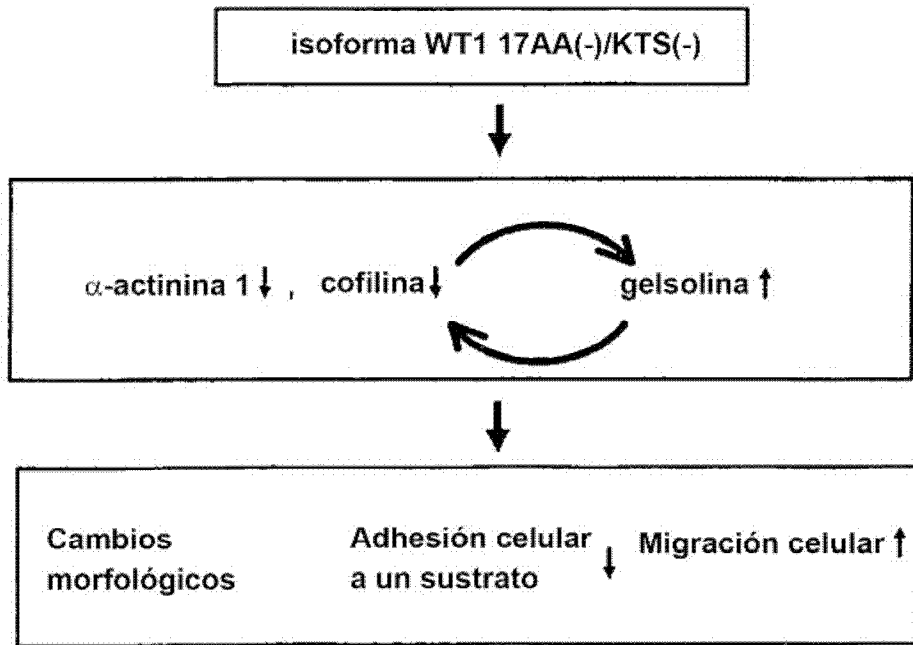


FIG. 9

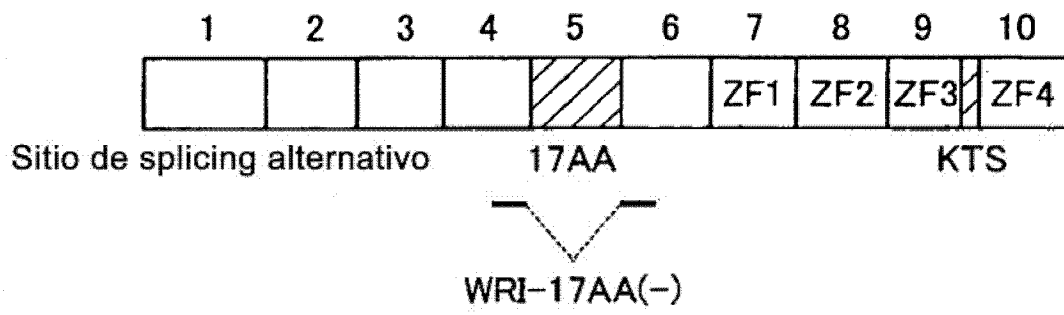


FIG. 10

EXPRESIÓN DE WT1

+

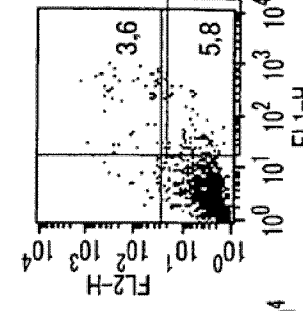
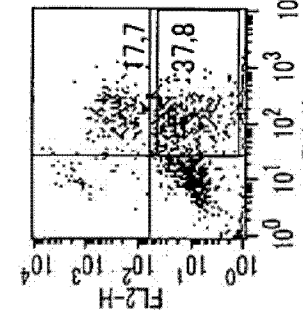
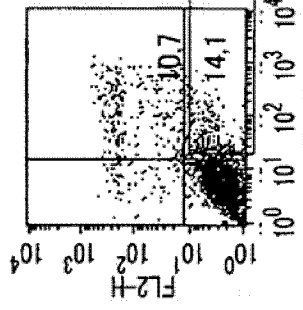
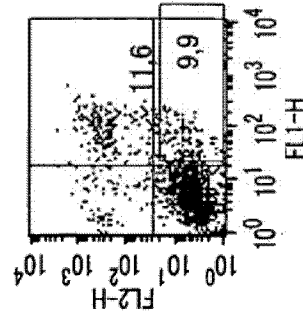
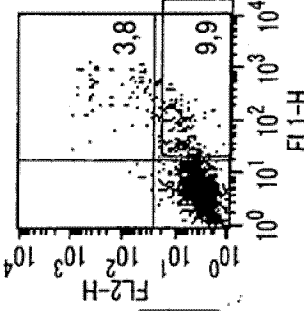
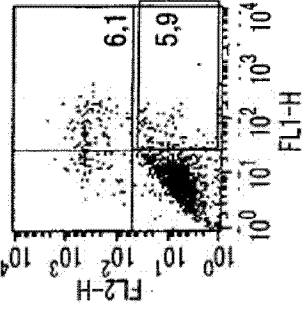
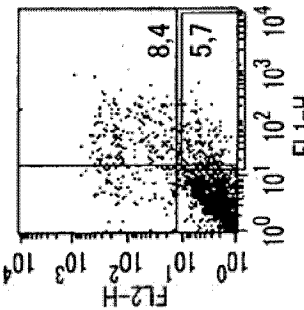
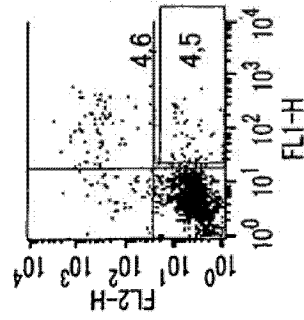
FIBROSARCOMA CÁNCER DE ESTÓMAGO GLIOMA CÁNCER DE PULMÓN

HT -1080T

AZ -521

A172

PC-14



PI



Anexina-V-FITC



FIG. 11

