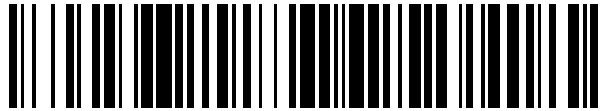


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 774**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2006 E 06766118 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 1915448**

54 Título: **Agentes de ácido nucleico para la regulación negativa de H19, y métodos de uso del mismo**

30 Prioridad:

07.07.2005 US 696795 P

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

23.12.2013

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY,
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
(100.0%)**

**HI TECH PARK, THE EDMOND J. SAFRA
CAMPUS, THE HEBREW UNIVERSITY OF
JERUSALEM, GIVAT RAM
91390 JERUSALEM, IL**

72 Inventor/es:

**HOCHBERG, AVRAHAM y
MATOUK, IMAD**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 435 774 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

Agentes de ácido nucleico para la regulación negativa de H19, y métodos de uso del mismo

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La presente invención entra dentro del campo de los ácidos nucleicos encargados de la disminución de la expresión del gen H19 y su uso en el tratamiento del cáncer.

10 [0002] El gen H19 fue el primer gen humano impreso no codificante de proteínas aislado que presentó expresión del alelo materno únicamente. También se trata de un gen impreso en los ratones. El H19 se mapeó en el brazo corto del cromosoma humano 11, banda 15.5, homóloga de una región del cromosoma murino 7. Pertenece a un grupo génico que, con toda probabilidad, no codifica un producto proteico. El gen H19 se expresa abundantemente durante la embriogénesis, pero desaparece de la mayor parte de tejidos tras el nacimiento. Sin embargo, diversos estudios realizados en diferentes tipos de tumores han demostrado una nueva expresión o sobre-expresión del gen H19 en comparación con tejidos sanos. Además, se observó una expresión desmesurada en el patrón alélico en algunos casos de cánceres de diferentes etiologías y linaje genético. A pesar de que el H19 muestra una expresión monoalélica en la mayor parte de tejidos durante el desarrollo, a excepción de las células germinales en ciertas etapas del proceso de maduración y de los trofoblastos extravelosos, se ha observado la expresión bialélica del gen (conocida como "relajación del sellado" o "pérdida del sellado", LOI en sus siglas en inglés) en diferentes tipos de cáncer, entre ellos, el carcinoma hepatocelular, neoplasmas de hígado de albúmina SV40 en ratas transgénicas para el T-antígeno, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de esófago y de ovarios, rhabdomioma, carcinoma cervical, de vejiga y de las células escamosas, cáncer colorrectal, de útero y tumores de las células germinales de testículo. Hoy en día, se ha encontrado expresión desregulada del gen H19 en cerca de 30 tipos de cáncer que fue comparada con tejidos sanos, tanto con presencia de LOI (pérdida del sellado en sus siglas en inglés), como sin. Consultar el trabajo de Matouk et al (Matouk et al, 2005, Gene Ther Mol Biol) para más referencias recientes.

20 [0003] Se ha demostrado, igualmente, que la sobre-expresión del H19 de origen ectópico induce a una mayor proliferación de las células epiteliales mamarias. El estudio se realizó en agar con ratones con diferentes inmunodeficiencias severas combinadas (SCID en sus siglas en inglés) (Lottin et al, 2002, Oncogene 21, 1625-1631). En tumores formados por la inyección de células de una línea celular derivada de un coriocarcinoma (JEG-3) y de una línea celular de carcinoma de vejiga (T24P), el nivel de H19 es muy alto en comparación con el nivel de H19 antes de la inyección (Rachmilewitz et al, 1995, Oncogene, 863-870).

30 [0004] También algunos carcinógenos tienen la capacidad de aumentar los niveles de expresión del gen H19. Se detectó un aumento significativo de los niveles de H19 RNA en el epitelio del tracto respiratorio de fumadores sin LOI (Kaplan et al, 2003, Cancer Res 63, 1475-1482). El BBN (un conocido carcinógeno de la vejiga) también tiene la capacidad de inducir la expresión del gen H19, como se demostró en ratas con cáncer de vejiga (Ariel et al, 2004, Mol Carcinog 41, 69-76). De la misma forma, la dietilnitrosamina (un conocido carcinógeno del hígado) fue utilizada en ratones con carcinoma hepatocelular para demostrar el aumento de niveles de H19 (Graveel et al, 2001, Oncogene 20, 2704-2712). Todos estos estudios, además de otros no mencionados, contradicen el supuesto inicial de que el gen H19 es un supresor de tumores.

40 [0005] Comparando los patrones de expresión génica en dos poblaciones celulares homogéneas cuya única diferencia es la presencia o ausencia del gen H19 RNA, se ha identificado varios descendientes efectores del H19 RNA, entre ellos varios grupos de genes de los que previamente se creía que desempeñaban papeles fundamentales en algunos aspectos del proceso tumorigénico. La presencia del gen H19 RNA podría aumentar la capacidad invasiva, migratoria y angiogénica de la célula por medio de una mayor concentración de los genes que operan en dichas vías, y contribuir de esta manera en las etapas iniciales, al menos, de la cascada metastásica. Otros estudios apuntan a un posible papel del H19 en potenciar la progresión del cáncer y la metástasis del tumor, ya que es un gen sensible al HGF/SF (factor de crecimiento y distribución de hepatocitos).

50 [0006] La expresión específica del gen H19 en células cancerosas ha llevado a su utilización en aplicaciones clínicas para la diagnosis del cáncer.

55 [0007] Así, la patente estadounidense número 5.955.273 de los presentes inventores expone el uso del gen H19 como marcador específico de tumores.

60 [0008] La publicación PCT número WO 9524503 demuestra el proceso de detección de malignidades y su clasificación con mediciones del gen H19 por medio de la hibridación in situ, lo cual es de gran utilidad a la hora de detectar la presencia o ausencia de malignidades en tumores de Wilms infantiles.

65 [0009] La publicación PCT número WO 04/031359 presenta la disminución de la presencia del gen H19 como forma de tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis, como el cáncer. Sin embargo, la disminución de los niveles de H19 no mostró una reducción en el tamaño o el volumen de los tumores, como tampoco se pudo demostrar la especificidad y la eficacia de agentes siRNA con capacidad para disminuir el nivel de H19. Asimismo, la

publicación PCT número WO 04/031359 no propone un método de utilización de antígenos H19 como parte de la terapia combinada para el tratamiento del cáncer.

5 **[0010]** Barteaux et al. (J Biol Chem 2005, p. 1-25) propone moléculas siRNA con objetivo de H19, que consiguen frenar in vitro el crecimiento de células de cáncer mamario.

[0011] La publicación PCT número WO 98/34613 presenta compuestos farmatológicos con presencia de quinazolinona para el tratamiento de malignidades.

10 **[0012]** La publicación PCT número WO 00/71707 muestra el uso de oligonucleótidos antisentido enfocados al gen D-11/H-19 en terapias para cánceres nasofaríngeos y de cérvix.

15 **[0013]** De forma que existe una necesidad ampliamente reconocida de métodos y composiciones que tengan la capacidad de disminuir los niveles de H19 para el tratamiento del cáncer, lo cual constituiría un gran avance.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 **[0014]** De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido aislado seleccionado de la patente EP 1 915 448 B1 perteneciente al grupo que consisten en el número de identificación de secuencia: 1, 2, 3 y 4.

25 **[0015]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se presenta un compuesto farmacológico que contiene un componente portador farmacológicamente aceptable, y el principio activo es un mínimo de un oligonucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en el número de identificación de secuencia: 1, 2, 3 y 4.

[0016] De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se presenta el uso de un oligonucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en el número de identificación de secuencia: 1, 2, 3 y 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

30 **[0017]** De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento del cáncer que consiste en:

- 35
- a) la administración o expresión de un agente capaz de disminuir el nivel y/o la actividad del H19 mRNA en un sujeto que necesite una cantidad con efecto terapéutico de dicho compuesto, y
 - b) proporcionar al sujeto una terapia para el cáncer, que constituirá su tratamiento.

40 **[0018]** De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un agente con capacidad para disminuir los niveles y/o actividad del H19 mRNA para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer, en combinación con una terapia para el cáncer.

45 **[0019]** De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento del cáncer que consiste en la administración o expresión de al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en el número de identificación de secuencia 1, 2, 3 y 4 en un sujeto que necesite una cantidad con efecto terapéutico, como tratamiento para el cáncer.

50 **[0020]** De acuerdo con un último aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un artículo de manufactura que consiste en un agente con capacidad para disminuir el nivel y/o la actividad del H19 mRNA y un agente anti cáncer adicional que ha probado su efectividad como tratamiento para el cáncer.

[0021] De acuerdo con otras características de las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica que se detallan a continuación, el agente capaz de disminuir el nivel y/o la actividad del H19 mRNA es un ácido nucleico.

55 **[0022]** De acuerdo con otras características adicionales de las formas preferidas de llevar a cabo la presente invención que se describen, el ácido nucleico se selecciona de un grupo que consiste en:

- 60
- a) un polinucleótido monocatenario para la inhibición de la transcripción del H19 RNA del gen H19;
 - b) un polinucleótido monocatenario para la hibridación con el H19 mRNA que conlleve a la reducción de la actividad del H19 mRNA;
 - c) un polinucleótido de doble cadena que conlleve a la degradación del H19 mRNA;
 - d) un polinucleótido formador de tríplex para dividir el H19 mRNA;
 - e) un polinucleótido catalítico para dividir el H19 mRNA;
- 65

- f) un polinucleótido monocatenario para la hibridación con el H19 mRNA que conlleve a su degradación enzimática; y 35(g) de secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen una de la (a) a la (f).

5 **[0023]** De acuerdo con otras características adicionales de las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica aquí descritas, el agente ácido nucleico se selecciona de un grupo consistente en un siRNA, una ribozima y una DNazima.

10 **[0024]** De acuerdo con más características de las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica descritas, el ácido nucleico es un siRNA.

15 **[0025]** De acuerdo con más características adicionales de las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica descritas, el siRNA contiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente en el número de identificación de secuencia: 1-4.

[0026] De acuerdo con más características adicionales las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica descritas, la administración se llevará a cabo in situ.

20 **[0027]** De acuerdo con más características adicionales las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica descritas, el cáncer se seleccionará del grupo de tumores sólidos pediátricos, tumores de Wilms, hepatoblastoma, rabdomiosarcoma embrionario, tumores de las células germinales, tumores del trofoblasto, tumores de las células germinales del testículo, teratoma inmaduro de ovario, tumores sacrocoxígeos, coriocarcinoma, tumores trofoblásticos del lecho placentario, tumores epiteliales adultos, carcinoma de la vejiga, carcinoma cervical, carcinoma pulmonar, carcinoma mamario, carcinoma de las células escamosas en la cabeza y el cuello, carcinoma de esófago, tumores neurogénicos, astrocitoma, ganglioblastoma y neuroblastoma.

25 **[0028]** De acuerdo con más características adicionales de las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica descritas, el cáncer tratado es un carcinoma de la vejiga o un carcinoma hepatocelular.

30 **[0029]** De acuerdo con más características adicionales de las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica descritas, el agente con capacidad para disminuir los niveles y/o la actividad del H19 mRNA se formula conjuntamente con el agente anti cancerígeno adicional.

35 **[0030]** La presente invención consigue resolver las deficiencias de las configuraciones conocidas hasta ahora que proporcionan agentes nucleótidos con capacidad para disminuir los niveles de H19 RNA tanto de forma aislada como en combinación con otros tratamientos del cáncer.

40 **[0031]** A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente se les da dentro del campo de conocimientos al que pertenece la presente invención. Más adelante se describirán los métodos y materiales adecuados para la puesta en práctica o el testeo de la presente invención, aunque es posible utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos.

45 **[0032]** En caso de conflicto, predominará la especificación contenida en la presente patente, incluyendo las definciones. Por otra parte, los materiales, métodos y ejemplos presentados tienen un fin ilustrativo y en ningún caso constituyen una limitación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

50 **[0033]** La invención se describe a continuación, a modo de ejemplo únicamente, haciendo referencia a los gráficos anexos. A continuación se hace referencia a los gráficos en mayor detalles, poniendo de relieve que las especificaciones aquí presentadas tienen como objetivo servir de ejemplo y constituyen una forma de ilustrar las formas preferidas de llevar la presente invención a la práctica únicamente. Los ejemplos presentados pretenden proporcionar lo que creemos que es la descripción más útil y comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención.

55 En este sentido, no trataremos de demostrar los detalles estructurales en más detalle del estrictamente necesario para poder conseguir un entendimiento básico de la invención. Mediante la descripción hecha a través de los gráficos debería quedar patente para los expertos en el campo de conocimiento cómo poner en práctica las diferentes formas que la invención puede adoptar.

60 **[0034]** En los gráficos:

65 Las figuras 1A-F son fotografías y diagramas esquemáticos que ilustran la presencia de una variante alternativa de splicing del H19 en especímenes humanos embrionarios y de la placenta. La figura 1A es una representación esquemática del cromosoma 11 en el que se muestra la ubicación del gen H19, compuesto

por 5 exones (E1-5) (caja sólida) y 4 intrones cortos (las líneas entre las cajas). La posición de los iniciadores usada en la reacción PCR está señalada mediante flechas horizontales y está entre 117 y 816 bases por debajo del sitio inicial de la transcripción. El segmento de splicing que falta está señalado mediante la casilla gris. Las figuras 1B-D son fotografías del gel teñido de bromuro de etidio para la reacción RT-PCR. Se analizaron las siguientes células: Hep3B y SKHep1 (líneas celulares de carcinomas hepatocelulares); RT4 y UMUC3 (líneas celulares de carcinoma de la vejiga; especímenes de placentas: 1st trim (primer trimestre); mola, mola hidatiforme; 3rd trim (tercer trimestre); LG-BC, cáncer de vejiga de bajo grado en sus siglas en inglés; HG-BC, cáncer de vejiga de alto grado en sus siglas en inglés; NB, vejiga normal en sus siglas en inglés; NC, colon normal en sus siglas en inglés; CClym, cáncer de colon con metástasis al ganglio linfático en sus siglas en inglés; CCliv, cáncer de colon con metástasis al hígado en sus siglas en inglés; CC, cáncer de colon en sus siglas en inglés; en las figuras 1B-D, las líneas marcadas con una C hacen referencia a un control negativo; M hace referencia al marcador en escalera de 100 bp. Los tamaños de los productos están indicados en el margen derecho de la página. La Figura 1E es una fotografía de un experimento de protección de la RNasa. Las puntas de flecha indican la presencia de variantes de las variantes alternativas de splicing) en 344 bases en tejido de placenta en el tercer trimestre. Asimismo, se encontraron otras dos bandas adicionales excesivas que podrían indicar la presencia de otra variante alternativa de splicing que no se había podido detectar en la reacción RT-PCR. La Figura 1F es un análisis de una secuencia parcial de una variante alternativa de splicing que presentó una región omisión de 366 bases del exón 1. La secuencia subrayada señala el punto de splicing (la numeración de nucleótidos comienza en el codón inicial).

Las figuras 2A-B son fotografías de los geles teñidos de bromuro de etidio que muestran el efecto de concentraciones en aumento de CoCl₂ en el nivel de expresión de H19 RNA en células Hep3B. La figura 2A ilustra los productos de la reacción RT-PCR del gen H19 en células Hep3B. La figura 2B ilustra los productos de la reacción RT-PCR del gen GAPDH en un control positivo de integridad de la reacción RT-PCR en células Hep3B para las figuras 2A y 2B y células Hep3B no tratadas (línea 1); y células tratadas con 50, 100, 200, 300 y 400 mM de CoCl₂ (líneas 2, 3, 4, 5 y 6) respectivamente.

Las figuras 3A-F son gráficos de barras y fotografías que ilustran la efectividad *in vitro* de la disminución de niveles de H19 por medio del uso de siRNAs descrito en la presente invención. Las figuras 3A-C son geles teñidos de bromuro de etidio que demuestran el efecto de los diferentes dúplex de H19 siRNA en el nivel de expresión de H19 en una línea celular Hep3B en condiciones normales de cultivo (figura 3A) y en condiciones que imitan la hipoxia (figura 3B), testeadas por medio de análisis RT-PCR. La figura 3A muestra las células Hep3B transfectadas con dúplex de siRNA no relacionados cuyo objetivo es el gen de la luciferasa (línea 1) y con cuatro dúplex de H19 siRNA (líneas 2-5) (número de identificación de secuencia 1-4) y sus mezclas equimolares (línea 6), y, por último, lipofectamina 2000 sin siRNA (de prueba) (línea 7). Nota: todos los agentes siRNA sometidos a tests (número de identificación de secuencia 1-4) presentaron un mínimo de un 50% de efectividad en la reducción de los niveles de mRNA en el gen H19. 1-4). Las figuras 3B y 3C muestran células Hep3B transfectadas en un medio normal con dúplex siRNA con objetivo del gen de la luciferasa (número de identificación de secuencia 5) (líneas 1 y 5) y con tres dúplex H19 siRNA diferentes (número de identificación de secuencia 1, 3 y 4) (líneas 2-4). A las 24 horas tras la transfección, se cambió el medio y se añadió un medio con 100nM de CoCl₂, a excepción de en la línea 5, que muestra células que continuaron creciendo en un medio normal de cultivo. La incubación duró otras 22 horas. Los productos de la reacción RT-PCR se muestran tanto para los genes H19 (figura 3B) como para los GAPDH (figura 3C), como control positivo de la integridad de RT-PCR. Las figuras 3D-E son geles teñidos de bromuro de etidio que demuestran los efectos de los dúplex H19 siRNA (número de identificación de secuencia 1) en los niveles de expresión de H19 en una línea celular UMUC3 en condiciones normales de cultivo y condiciones de hipoxia por medio de análisis RT-PCR. En las figuras 3F y 3G vemos células UMUC3 transfectadas con GFP siRNA (línea 1), además de H19 siRNA con número de identificación de secuencia 1 (línea 2) en condiciones de normoxia, y células UMUC3 transfectadas con GFP siRNA (línea 3) además de H19 siRNA (línea 4) en condiciones de hipoxia respectivamente. La figura 3F es una gráfica de barras que muestra la reducción en la colonia seguido de la recuperación de la hipoxia, seguido de la transfección de H19 siRNA (número de identificación de secuencia 3) en células Hep3B en comparación con células tratadas de un control GFP siRNA.

Las figuras 4A-D son gráficos de barras y fotografías que muestran que la disminución transitoria de los niveles de H19 RNA en las células Hep3B inhibe la tumorigenicidad *in vivo*. Se transfectó de forma transitoria las células Hep3B con H19 siRNA 3 (número de identificación de secuencia 3) o anti luc siRNA (número de identificación de secuencia 5). Después de 48 horas, se lavó las células dos veces con PBS, se tripsinizaron y se realizó un conteo. Se inyectó de forma subcutánea en el dorso de ratones atímicos CD-1 (n=7 para ambos y 4 para los del grupo de control) 1,5x10⁶ células con anti-H19 siRNA y anti-luc siRNA. Se pudo observar tumores palpables 15 días después de la inoculación en los ratones inoculados con células Hep3B, transfectados transitoriamente con anti-luc siRNA. Se hizo un seguimiento del tamaño de los tumores, se hicieron mediciones por medio de calibradores hasta el día 30 después de la inoculación. A continuación, se procedió a sacrificar a los ratones. Se observaron reducciones significativas (p<0,03) en alrededor de un 82% de los sujetos, tanto en el peso medio de los tumores (A) (error estándar 6) como en el volumen medio de los tumores (p<0,03) (B) (error estándar 6). Los valores representan puntos finales justo antes y después de sacrificar a los animales. También se muestran características representativas de los tumores en 2 ratones de cada grupo (los ratones 1 y 2 son los animales tratados con H19 siRNA3,

número identificativo de secuencia 3, y los ratones 3 y 4 son los animales tratados con anti-luc siRNA, número de secuencia 5), antes de la exposición quirúrgica del tumor (C), y después de la exposición de los tumores internos (D).

Las figuras 5A-D son gráficos de barras y fotografías que demuestran el efecto in vivo de siRNA-H19 en células de carcinoma humano de vejiga UMUC3. Se inyectó de forma subcutánea un millón de células UMUC3 en ratones atímicos (n=3 para GFP siRNA, número de identificación de secuencia 6, y 5 para siRNA H19, número de identificación de secuencia 1) después de 48 horas de transfección transitoria con siRNAs. Se observó tumores palpables 6 semanas después del procedimiento en 2 de los 3 ratones transfectados transitoriamente con UMUC3 con anti-GFP-siRNA, pero no en los ratones inoculados con siRNA H19 (n=5). Se sacrificó a los ratones 8 semanas después de la inoculación. Se describe el volumen medio (B, $P < 0,05$) y el peso medio de los tumores (A, $p < 0,06$). Los valores representan los puntos finales justo antes y después de sacrificar a los animales. Las fotografías exponen las características externas de los tumores de los ratones inoculados con UMUC3 transfectado con anti-GFP siRNA (C) y siRNA H19 (D).

La figura 6 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la transfección de H19 siRNA (número de identificación de secuencia 3) en células Hep3B que proliferan en condiciones normales de cultivo.

Las figuras 7A-D son gráficos de barras y lineares que demuestran el efecto de la administración intratumoral de H19 siRNAs (número de identificación de secuencia 1 y 3) o anti GFP siRNA (número de identificación de secuencia 6) en células UMUC3 previamente inyectadas con carcinoma de vejiga humano (figuras 7A-B) con número de identificación de secuencia 1, y células Hep3B (número de identificación de secuencia 3) en ratones atímicos CD-1. La figura 7A es un gráfico de líneas que describe el cambio en el volumen del tumor después de la inyección de siRNA-H19 (número de identificación de secuencia 1) o anti GFP siRNA en ratones sometidos a tratamiento por UMUC-3. La figura 7B es un gráfico de barras que muestra los cambios en el peso del tumor después de la inyección de siRNA-H19 o anti GFP siRNA en ratones sometidos a tratamiento por UMUC-3. La figura 7C es un gráfico de barras que presenta el volumen del tumor después de la inyección de siRNA-H19 o anti GFP siRNA en ratones sometidos a tratamiento por Hep3B. La Figura 7D es un gráfico de barras que muestra los cambios en el peso del tumor después de la inyección de siRNA-H19 (número de identificación de secuencia 3) o anti GFP siRNA en ratones sometidos a tratamiento por Hep3B.

Las figuras 8A-D son gráficos de barras y fotografías que muestran los efectos de la expresión ectópica del gen H19 en el crecimiento de células de carcinoma humano de vejiga TA11 (negativas para H19) y TA31 (con alta expresión de H19) in vivo: se implantó de forma subcutánea la misma cantidad (2×10^6) de células TA31H19-high y TA11H19-ve en ratones CD-1 (n=5). Dos semanas más tarde, se pudo observar la aparición de tumores cuyo volumen se midió durante dos semanas adicionales por medio de un calibrador. Se presentan aquí las mediciones finales hechas de los volúmenes medios de los tumores en los dos grupos (figura 8A), la cinética media de los tumores (figura 8B) y la morfología representativa de los tumores derivados de las células TA11H19-ve (figura 8C) y TA31H19-high (figura 8D).

Las figuras 9A-C son fotografías que muestran que el estrés por hipoxia induce la proliferación de H19 RNA en la línea celular Hep3B y que siRNA con objetivo directo contra H19 impide muy eficientemente dicha proliferación. Se sembró las células Hep3B y se transfectaron bien con anti H19 siRNA, bien con anti-luc siRNA. 24 horas después de la transfección, se dispuso una parte de las células en una jarra Aneorpack rectangular (Mitsubishi Chemical Company, Japón) para crear condiciones similares a la hipoxia en una hora, y otra parte a concentración normal de oxígeno. La incubación duró 24 horas, tras lo cual se procedió a la extracción del RNA. Se muestran los análisis por reacción RT-PCR en H19 RNA. Figura 9A: células Hep3B transfectadas con anti-luc siRNA (número de identificación de secuencia 5) (líneas 1, 2) y anti H19 siRNA (número de identificación de secuencia 3) (líneas 3 y 4) tanto en condiciones normales de cultivo (líneas 1 y 3) como en condiciones de hipoxia (líneas 2 y 4). Los análisis PCR de un gen constitutivo, el GAPDH (figura 9B), y uPAR (figura 9C).

DESCRIPCIÓN DE LAS PUESTAS EN PRÁCTICA PREFERIDAS DE LA INVENCION

[0035] La presente invención entra dentro del campo de los ácido nucleicos capaces de disminuir el nivel y/o la actividad del H19 y los compuestos farmacológicos y métodos para usarlos. Más en concreto, la presente invención se refiere a los métodos y compuestos utilizados en el tratamiento del cáncer.

[0036] Antes de explicar al menos una de las formas de llevar a la práctica la presente invención, es necesario entender que la invención no se limita, en lo a que aplicación se refiere, a los detalles especificados más adelante en la descripción de la invención o en el apartado de Ejemplos. La invención puede ser llevada a cabo de varias formas diferentes. Además, es preciso puntualizar que la fraseología y terminología utilizada a lo largo del presente documento tiene como objetivo describir la invención y no debe ser comprendida como una limitación de esta.

[0037] El gen H19 es un gen impreso que presenta una expresión maternal monoalélica y es muy probable que no tenga la capacidad o función de codificar a una proteína. Su expresión durante la fase de la embriogénesis y el desarrollo fetal es muy abundante, pero normalmente desciende hasta niveles imperceptibles tras el nacimiento en la mayor parte de tejidos. Sin embargo, se ha observado un aumento de los niveles de expresión de H19 RNA en diferentes cánceres de orígenes diversos, así como un patrón de expresión aberrante en algunos de los casos, lo cual hace pensar que el H19 podría desempeñar un papel importante en la tumorigénesis.

- 5 **[0038]** Mientras ponían el método presentado en práctica, los desarrolladores de esta invención diseñaron por medio del uso de modelos de la bioinformática siRNAs específicos que son capaces de disminuir los niveles de H19 mRNA. Los siRNAs de la presente invención se seleccionaron gracias a cuatro buscadores diferentes para asegurar que se escogían los siRNAs más apropiados.
- 10 **[0039]** Como se muestra en la figura 3A, todos los siRNAs generados mostraron capacidad para disminuir H19 mRNA. Además, los inventores mostraron cómo estos siRNAs son capaces de disminuir H19 mRNA tanto en condiciones normales como en condiciones de hipoxia (figuras 3B-E). Esto es especialmente importante, ya que la hipoxia está asociada a los tumores, y por lo tanto al aumento de H19 RNA.
- 15 **[0040]** Los siRNAs de la presente invención mostraron capacidad tanto para prevenir la formación de tumores como para frenar la enfermedad una vez manifestada, ya que los tumores experimentaron una disminución en peso y volumen.
- 20 **[0041]** Como se muestra en el Ejemplo 4, la administración de células de carcinoma humano (Hep3B y UMUC3) previamente transfectadas con H19 siRNA en ratones tuvo un efecto significativo en la reducción del peso del tumor (figuras 4A y 5A) y su volumen (figuras 4B y 5B) en comparación con la administración de las mismas células transfectadas con control siRNA.
- 25 **[0042]** Además, como se muestra en el Ejemplo 6, la inyección directa de H19 siRNA en los tumores provocó una disminución en el número de células UMUC3, redujo de forma notable los volúmenes medios de los tumores en cerca de un 90% (figura 7A) y los pesos medios de los tumores en un 88%, aproximadamente (figura 7B).
- 30 **[0043]** En los tumores inducidos por células Hep3B, se observó una reducción de cerca de un 40% en el peso de los tumores (figura 7C) y un 56% en el volumen de los tumores (figura 7D) tras la administración de H19 siRNA.
- 35 **[0044]** En conjunto, estos resultados demuestran sin ninguna duda la capacidad de estos agentes para disminuir los niveles de H19 y su validez como posibles métodos de tratamiento profiláctico y terapéutico del cáncer.
- 40 **[0045]** La presente invención también contempla la posibilidad de utilizar los agentes con capacidad para disminuir los niveles de H19 mRNA en terapia combinada. Es bien sabido que los tumores sólidos, sobre todo los que se instalan en regiones con hipoxia, resisten las actuales terapias contra el cáncer. La presente invención propone un método para sensibilizar al paciente por medio de la administración de antígenos H19 antes de someterlo a una terapia para el cáncer preestablecida (por ejemplo, radioterapia o quimioterapia).
- 45 **[0046]** Así, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un artículo para la manufactura de un compuesto que contenga un agente con capacidad para disminuir los niveles y/o la actividad del H19 mRNA y un agente anticancerígeno adicional específico para el tratamiento del cáncer.
- 50 **[0047]** En adelante, el término "tratamiento" hace referencia a la prevención, la paliación o la disminución de los síntomas asociados con la enfermedad cancerosa. Preferiblemente, las curas o tratamientos, por ejemplo, están enfocadas a eliminar de forma sustancial los síntomas asociados con el cáncer.
- 55 **[0048]** Cualquier cáncer con expresión de H19 es susceptible de recibir tratamiento de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Preferiblemente, los tumores tratados de acuerdo con el método presentado en la invención serán aquellos que expresen H19 mRNA en la formación inicial y en posteriores estadios del tumor. Entre dichos tumores se incluyen los siguientes ejemplos que no suponen en ningún momento una limitación: tumores sólidos pediátricos, tumores de Wilms, hepatoblastomas, rhabdomiocarcinoma embrionario, tumores de las células germinales y tumores trofoblásticos, tumores de las células germinales del testículo, teratoma inmaduro de ovarios, tumores sacrococigeales, coriocarcinomas, tumores trofoblásticos del lecho placentario, tumores epiteliales adultos, carcinoma de la vejiga, carcinoma hepatocelular, carcinoma de ovario, carcinoma cervical, carcinoma pulmonar, carcinoma mamario, carcinoma de las células escamosas en cabeza y cuello, carcinoma de esófago, tumores neurogénicos, astrocitomas, ganglioblastomas, neuroblastomas. Preferiblemente, se utilizará para tratar el carcinoma de vejiga o el carcinoma hepatocelular.
- 60 **[0049]** En adelante, el término "sujeto" se utilizará haciendo referencia a cualquier sujeto (por ejemplo, un mamífero), preferiblemente un sujeto humano.
- 65 **[0050]** En adelante, la expresión "H19 mRNA" se utilizará haciendo referencia a un producto de la transcripción del gen H19 (GenBank Accession No. M32053 – número de identificación de secuencia: 7).
- [0051]** Los autores de la presente invención han identificado una nueva isoforma separada del gen H19RNA que se expresa específicamente en los tejidos embrionarios y no en las células de carcinoma como se demostró por medio de análisis RT-PCR (figuras 1B-D) y un estudio de protección RNasa (figura 1E). Esta nueva isoforma no tiene parte del exón-1 que se extiende del nucleótido 252 al 588 del sitio inicial de transcripción en comparación con la transcripción de H19 conocida y establecida con número de identificación de secuencia: 7. De la misma forma, el

H19 RNA de este aspecto de la presente invención contiene preferiblemente el exón 1 de la transcripción del H19 y, más preferiblemente, contiene una secuencia RNA denotada por coordinados de secuencia de ácido nucleico del 252 al 588 con número de identificación de secuencia: 7.

5 **[0052]** Dado que el H19 no codifica proteínas, la disminución del nivel o de la actividad de H19mRNA se hace preferiblemente a nivel de RNA.

10 **[0053]** Preferiblemente, la disminución del nivel y/o la actividad del H19 es mayor de 10%; más preferiblemente, mayor de un 20%; aún más preferiblemente, mayor de un 40%; todavía más preferiblemente, mayor de un 60%; más preferiblemente, mayor de un 80%; y, en el mejor de los casos, de un 100%.

[0054] Preferiblemente, el agente es un ácido nucleico. Más preferiblemente, el agente es un oligonucleótido, y aún más preferiblemente un oligonucleótido de doble cadena.

15 **[0055]** La disminución del nivel de H19 mRNA se puede conseguir por medio de diferentes mecanismos: inhibiendo la transcripción del gen H19 al gen H19 RNA; inhibiendo el proceso de maduración de hnRNA a mRNA; fomentando la degradación del mRNA en el citoplasma con enzimas (formando dúplex y tríplex, y por rotura catalítica de las enzimas con base de ácido nucleico (DNAzimas y RNAzimas).

20 **[0056]** Así, el antígeno H19 mRNA descrito en la invención se puede seleccionar de los siguientes:

- 1) una secuencia monocatenaria de ácido nucleico para inhibición estérica de la transcripción del H19 RNA de su gen;
- 25 2) una secuencia monocatenaria de ácido nucleico para la hibridación con H19 RNA que produzca una degradación enzimática (por ejemplo, RNAsas);
- 3) una secuencia de doble cadena de ácido nucleico que produzca la degradación del H19 (por medio de la formación de siRNA);
- 30 4) un secuencia catalítica de ácido nucleico para romper el H19 mRNA;
- 5) un nucleótido formador de tríplex;
- 35 6) una secuencia monocatenaria de ácido nucleico para la hibridación del H19 mRNA que consiga reducir la actividad del H19 mRNA; y
- 7) secuencias de ácido nucleico que codifiquen cualquiera de la (1) a la (6).

40 **[0057]** De acuerdo con una forma de poner en práctica este aspecto de la presente invención, el agente es un ácido nucleico que se compone de una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con el H19 RNA de la presente invención, tal como se ha expuesto previamente (por ejemplo, en células bajo condiciones fisiológicas).

45 **[0058]** En adelante, el término "agente ácido nucleico" hace referencia a un oligómero o poligómero monocatenario o de doble cadena de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA) o equivalentes. Este término abarca también a los polinucleótidos compuestos por bases naturalmente presentes, azúcares, enlaces covalentes internucleósidos (por ejemplo, el esqueleto), así como polinucleótidos que contengan fragmentos no naturales que funciones de forma similar a sus equivalentes naturales.

50 **[0059]** En adelante, la expresión "capaz de hibridar" hace referencia a la capacidad para apareamiento entre dos bases, unión en la que como mínimo una cadena del agente ácido nucleico es al menos en parte homóloga al H19mRNA.

55 **[0060]** Preferiblemente, los agentes ácido nucleicos de la presente invención hibridan específicamente con el H19 RNA de la presente invención, es decir, contienen al menos una preferencia de 5 pliegues para hibridar con H19 RNA, en contraste con una molécula no relacionada con el RNA (por ejemplo, GAPDH).

60 **[0061]** Los agentes ácido nucleicos diseñados de acuerdo con lo expuesto en la presente invención pueden generarse de acuerdo a cualquier método de síntesis de ácidos nucleicos conocido en el estado de la técnica, lo cual incluye la síntesis enzimática y la síntesis sólido-fase. El equipo y los reactivos necesarios para llevar a cabo la síntesis sólido-base se pueden adquirir de laboratorios como por ejemplo Applied Biosystems. Se puede emplear cualquier otro medio para sintetizar los compuestos; la síntesis de los agentes de ácidos nucleicos en sí no debe suponer ningún problema para los profesionales del sector y se puede realizar por medio del uso de las metodologías comunes, tal y como se explica en detalle en obras como: Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R. M. et al., eds. (1994, 1989), "Current Protocols in Molecular Biology," volúmenes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), "A Practical Guide to Molecular

65

Cloning," John Wiley & Sons, New York; y Gait, M. J., ed.(1984), "Oligonucleotide Synthesis"; utilizando química sólido-fase, por ejemplo, cianoetil fosforamidita, desprotección, desalación, purificación y, por ejemplo, un método automático de tritil-on o HPCL.

5 **[0062]** Se podrá apreciar que los agentes ácidos nucleicos de la presente invención también pueden generarse utilizando un vector de expresión tal y como se describe en más detalles más adelante.

[0063] Preferiblemente, los agentes ácidos nucleicos de la presente invención están modificados, lo cual puede realizarse por medio de diversos métodos conocidos en el estado de la técnica.

10 **[0064]** Por ejemplo, los agentes ácidos nucleicos de la presente invención pueden contener nucleósidos heteroclíticos que consten de purinas o de bases pirimidinas, unidos por enlace fosfodiéster 3'-a-5'.

15 **[0065]** Preferiblemente, los agentes ácidos nucleicos que se utilizarán serán aquellos que tengan esqueleto, enlaces internucleósidos o bases modificadas, como se explica más adelante en todo detalle.

[0066] Ejemplos específicos de los agentes ácidos nucleicos preferidos de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que contengan esqueletos modificados o enlaces internucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos o polinucleótidos con esqueleto modificado incluyen a aquellos que retienen el átomo de fósforo en el esqueleto, como se expone en las patentes estadounidenses número: 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

25 **[0067]** Los oligonucleótidos con esqueleto modificado preferido incluyen, por ejemplo: fósforotioatos; fósforotioatos quirales; fósforodtioatos; fósforotriésteres; fósforotriésteres aminoalquilos; metilos y y otros fosfonatos de alquilo, incluyendo fofonatos 3 alquilenos y fosfonatos quirales; fosfinatas; fósforoamidatas, incluyendo fósforoamidatas 3'aminos y aminoalquilofosforoamidatas; tionofósforoamidatas; fosfonatos de tionalquilo; fosfotriésteres de tionalquilo; y boranofosfatos con enlaces normales 3'-5', enlaces 2'-5' análogos y aquellos que presenten polaridad invertida cuando los pares de las unidades de nucleósidos adyacentes están enlazadas en 3'-5' to 5'-3' or 2'-5' to 5'-2'. Se podrá usar igualmente varias sales, sales mixtas, y formas con ácido libre de las modificaciones arriba mencionadas.

35 **[0068]** Igualmente, los esqueletos de oligonucleótidos no modificados que no incluyen átomo de fósforo tendrán esqueletos formados por enlaces internucleósidos de alquilos o cicloalquilos de cadena corta, enlaces internucleósidos mixtos de heteroátomos y alquilos o cicloalquilos, o uno o varios enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tengan enlaces morfolino (formados en parte por la fracción del azúcar de un nucleósido); esqueletos siloxane; esqueletos de sulfidasm sulfoxidas y sulfonas; esqueletos de formacetilos y tioformacetilos; esqueletos de formacetil metileno y tioformacetil; esqueletos con alqueno; esqueletos de sulfamato; and esqueletos de metilamina y hidracino metileno; esqueletos de sulfonato y sulfonamidas; esqueletos de amidas; y otros esqueletos compuestos por partes de N, O, S y CH₂, tal y como se explica en las patentes estadounidense número: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

45 **[0069]** Otros agentes ácidos nucleicos que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención son aquellos que contienen tanto azúcar como enlace internucleósido modificado, es decir, el esqueleto de las unidades nucleótidas se reemplaza con grupos nuevos. Las unidades bases se conservan y complementan con el marcador de polinucleótido objetivo correspondiente. Un ejemplo de un oligonucleótido equivalente al que acabamos de describir incluye un PNA (ácido nucleico peptídico). Un oligonucleótido PNA es un oligonucleótido en el que se ha reemplazado el esqueleto formado por un azúcar con otro que contiene una amida, en particular, un esqueleto de aminoetilglicina. Las bases se conservan y se unen directa o indirectamente al átomo de aza-nitrógeno del fragmento amida del esqueleto. Las patentes estadounidenses que muestran cómo preparar los compuestos PNA incluyen, sin que ello suponga ninguna limitación, las patentes estadounidenses número: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262.

[0070] Otras modificaciones de esqueleto que pueden utilizarse para la presente invención se describen en la patente estadounidense número 6.303.374.

60 **[0071]** Los agentes ácidos nucleicos de la presente invención también pueden contener modificaciones de base o sustituciones. En adelante, la expresión bases "sin modificar" o "naturales" incluyen bases de purina, adenina (A) y guanina (G) y bases de pirimidina, tiamina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases "modificadas" incluyen, sin que ello suponga una limitación, bases naturales y sintéticas, como: 5-metilcitosina (5-me-C); 5-hidroximetil citosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; 6-metil y otros derivados alquilos de la adenina y la guanina; 2-propil y otros derivados alquilos de la adenina y la guanina; 2-tiouracilo, 2-tiotimina, y 2-tiocitosina; 5-halouracilo y citosina; 5-propinil uracilo y citosina; 6-azo uracilo, citosina, y timina; 5-uracilo (pseudouracilo); 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-

tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilol, y otros 8-sustituidos adeninas y guaninas; 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometil, y otros 5-sustituidos uracilos y citosinas; 7-metilguanina y 7-metiladenina; 8-azaguanina y 8-azaadenina; 7-deazaguanina y 7-deazaadenina; y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras bases modificadas que pueden utilizarse están descritas en las patente estadounidenses número 3.687.808; Kroschwitz, J. I., ed. (1990), "The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering," páginas 858-859, John Wiley & Sons; Englisch et al. (1991), "Angewandte Chemie," International Edition, 30, 613; and Sanghvi, Y. S., "Antisense Research and Applications," Capítulo 15, páginas 289-302, S. T. Crooke and B. Lebleu, eds., CRC Press, 1993. Dichas bases modificadas son especialmente útiles para conseguir un aumento en la afinidad del enlace de los compuestos oligoméricos de la invención. Entre ellas se encuentran la pirimidina 5'-sustituidos, 6-azapirimidinas, y N-2, N-6, y purinas O-6-sustituidos, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo, and 5-propinilcitosina. Se ha probado que las as susticiones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex del ácido nucleico en entre 0,6 y 1,2°C (Sanghvi, Y. S. et al. (1993), "Antisense Research and Applications," páginas 276-278, CRC Press, Boca Raton). En la actualidad, se prefieren para la invención sustituciones de base, sobre todo cuando se combinan con modificaciones de azúcares 2'-O-metoxietil.

[0072] Los agentes ácidos nucleicos de la presente invención cuentan con un mínimo de 10, 15 o 17 bases capaces de hibridar específicamente con H19 RNA. Como se muestra en el Ejemplo 1, los siRNAs de la presente invención cuentan con 19 bases con dos 3' salientes.

[0073] Es importante entender que la presente invención también tiene en cuenta otros agentes que no sean agentes ácidos nucleicos, siempre que tengan la capacidad de disminuir los niveles de H19 RNA, como agentes eliminatorios.

[0074] Una molécula pequeña de RNA (siRNA) de interferencia es un ejemplo de un agente ácido nucleico con capacidad para disminuir los niveles de H19 RNA. El proceso de interferencia RNA consta de dos etapas. Durante la primera, llamada etapa inicial, se introduce el dsRNA que es digerido entre 21-23 nucleótidos (nt) pequeños de RNA (siRNA) de interferencia, probablemente por medio de la acción de Dicer, que pertenece a la familia RNasa III de ribonucleasas específicas para dsRNA. Este divide la dsRNA (se introduce directamente o por medio de un vector con expresión, un cassette o un virus) de forma ATP-dependiente. A continuación tienen lugar episodios de división sucesivos que degradan el RNA en entre 19 y 21 dúplex bp (siRNA), cada cadena contendrá entonces 2-nucleótidos 3' salientes [Hutvagner and Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002); y Bernstein Nature 409:363-366 (2001)].

[0075] En la etapa efectora, los dúplex de siRNA se unen al complejo nucelasa para formar un complejo silenciador inducido por el RNA (RISC en sus siglas en inglés). Se requiere un componente ATP-dependiente separado del siRNA para la activación del RISC. El RISC activo se dirige entonces a las transcripciones homólogas por medio de interacciones de apareado de bases y divide el mRNA en 12 fragmentos de nucleóido del terminal 3' del siRNA [Hutvagner and Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002); Hammond et al., (2001) Nat. Rev. Gen. 2:110-119 (2001); and Sharp Genes. Dev. 15:485-90 (2001)]. A pesar de que todavía hay que determinar el mecanismo de división, los estudios hasta la fecha indican que cada RISC contiene un siRNA único y una RNasa [Hutvagner and Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002)].

[0076] Es posible no realizar la "etapa inicial" proporcionando una siRNA inicial.

[0077] Teniendo en cuenta el potencial de RNAi, se sugiere ampliar la etapa por la vía de RNAi. Dicha ampliación se llevaría a cabo mediante la copia de la dsRNAs de entrada para generar más siRNAs o replicar los siRNAs ya formadas. Alternativamente o además, se puede efectuar la ampliación por medio de varios eventos de cambios del RISC [Hammond et al., Nat. Rev. Gen. 2:110-119 (2001), Sharp Genes. Dev. 15:485-90 (2001); Hutvagner and Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002)]. Para más información sobre el RNAi, véase los siguientes trabajos de Tuschl ChemBiochem (completar) 2:239-245 (2001); Cullen Nat. Immunol. 3:597-599 (2002); y Brantl Biochem. Biophys. Act. 1575: 15-25 (2002).

[0078] La síntesis de moléculas RNAi apropiadas para el uso en la presente invención se puede llevar a cabo como se describe a continuación. En primer lugar, se escanea la secuencia hacia abajo para secuencias dinucleótidas AA de la secuencia de ácido nucleico H19 objetivo. Cada AA y los 19 nucleótidos 3' adyacentes se registra como posibles sitios objetivo del siRNA.

[0079] En segundo lugar, se comparan los posibles sitios objetivos en una base de datos con los genomas adecuados (por ejemplo, de humano, de ratón, de rata, etc.) utilizando cualquier software de alineación de secuencias, como puede ser el BLAST, que se puede obtener en el servido NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se seleccionan aquellos objetivo putativos que muestran una similitud significativa con otras secuencias codificadoras.

[0080] Las secuencias objetivo que cumplan los requisitos se seleccionan como plantilla para la secuencia de siRNA. Las secuencias preferidas son aquellas que incluyen un bajo contenido en G/C, ya que este tipo de secuencias ha demostrado tener una mayor efectividad a la hora de mediar en el silenciamiento de genes en

comparación con secuencias con más de un 55% de contenido de G/C. Se selecciona preferiblemente varios sitios objetivos a lo largo del gen objetivo para su evaluación. Para una mejor evaluación de los siRNAs seleccionados, se lleva a cabo además un control negativo, preferiblemente. Dicho control incluirá preferiblemente el mismo compuesto nucleídeo que siRNA pero tendrá una similitud significativamente inferior con el genoma. Así, se utiliza preferiblemente una secuencia codificada de nucleótido del siRNA, siempre que no presente una similitud significativa con cualquier otro gen.

[0081] Los ejemplos de siRNAs capaces de disminuir el nivel de H19 que se pueden usar de acuerdo con este aspecto de la presente invención son los establecidos por número de identificación de secuencia: 1-4.

[0082] Dado que se ha probado la efectividad de estas moléculas para reducir el tamaño y el volumen de tumores, la presente invención también contempla el tratamiento del cáncer haciendo uso de estas moléculas únicamente, en lugar de estar necesariamente en combinación con otro tratamiento.

[0083] Otro agente con capacidad para disminuir la expresión de un H19 RNA es la molécula de DNAzima capaz de romper específicamente su polinucleótido codificador. Las DNAzimas son agentes ácidos nucleicos monocatenarios capaces de romper secuencias objetivo tanto monocatenarias como de doble cadena (Breaker, R.R. y Joyce, G. Chemistry and Biology 1995; 2:655; Santoro, S.W. & Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997;94:4262). Se propone un modelo general de DNAzima (el modelo 10-23). Las DNAzimas "10-23" contienen un dominio catalítico de 15 deoxiribonucleótidos flanqueados por dos dominios de reconocimiento de sustrato, cada uno con entre siete y nueve deoxiribonucleótidos. Este tipo de DNAzima puede romper eficazmente su sustrato de RNA para obtener juntas purina:pirimidina (Santoro, S.W. & Joyce, G.F. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 199; para trabajos sobre las DNAzimas, véase Khachigian, LM [Curr Opin Mol Ther 4:119-21 (2002)].

[0084] La patente estadounidense número 6.326.174 de Joyce et al. presenta ejemplos de la construcción y amplificación de DNAzimas sintéticas creadas por ingeniería que son capaces de reconocer sitios de división objetivos en secuencias monocatenarias y de doble cadena. Recientemente se observó que las DNAzimas de un diseño similar contra el receptor humano de la urokinasa inhibían la expresión de dicho receptor, de forma que inhibían la metástasis de células de cáncer de colon in vivo (Itoh et al., 20002, Abstract 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther www.asgt.org). En otra aplicación, las DNAzimas complementarias para oncógenos bcr-ab 1 consiguieron inhibir la expresión de oncógenos en células de leucemia, reduciendo así las tasas de relapso en trasplante de médula espinal autologas en casos de Leucemia Mieloide Crónica (CML en sus siglas en inglés) y Leucemia Linfocítica Aguda (ALL).

[0085] Otro agente capaz de disminuir la H19RNA es la molécula de ribozoma capaz de romper específicamente su polinucleótido codificador. Actualmente se está utilizando ribozimas cada vez más para la inhibición con secuencia objetivo de la expresión de genes por medio de la división de mRNAs que codifican proteínas que son de interés [Welch et al., Curr Opin Biotechnol. 9:486-96 (1998)]. La posibilidad de diseñar ribozimas que rompan cualquier objetivo de RNA específico los ha convertido en herramientas de gran utilidad tanto en investigación primaria como en aplicaciones terapéuticas. En este último campo, las ribozimas se utilizan con objetivo de RNAs de virus en enfermedades infecciosas, de oncógenos dominantes en cánceres y de mutaciones somáticas específicas en enfermedades genéticas [Welch et al., Clin Diagn Virol. 10:163-71 (1998)]. Son sobre todo notables varios protocolos de terapia génica con ribozimas para pacientes con VIH que actualmente se encuentran en la fase inicial de los ensayos. Más recientemente, se ha utilizado ribozimas se han utilizado para investigación en animales transgénicos, validación de genes objetivos y dilucidación de las vías. Actualmente hay varios ensayos clínicos en diferentes fases que utilizan ribozimas. La ANGIOZYME fue la primera ribozima sintetizada químicamente para su estudio en ensayos clínicos con humanos. ANGIOZYME se utiliza para inhibir específicamente la formación de VEGF-r (factor de crecimiento epitelial vascular en sus siglas en inglés), un componente clave en la vía de angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., y otras empresas farmacéuticas han demostrado la importancia de la terapia anti-angiogénesis en modelos animales. La HEPTAZYME, una ribozima diseñada para destruir selectivamente el virus de la Hepatitis C RNA (HCV en sus siglas en inglés) ha demostrado su eficacia para disminuir el RNA viral de la Hepatitis C en ensayos con cultivos celulares (Ribozyme Pharmaceuticals Incorporated - <http://www.rpi.com/index.html>).

[0086] Un método adicional para disminuir H19RNA es por medio de oligonucleótidos formadores de tríplex (TFO en sus siglas en inglés). En la última década, diferentes estudios han demostrado que los TFOs se pueden diseñar con capacidad para reconocer y unirse a regiones de polipurina/polipirimidina en DNA helicoidal de doble cadena con objetivo de secuencia específico. Así, la secuencia de DNA que codifica el H19 RNA de la presente invención puede convertirse en objetivo de la molécula de RNA encargada de la disminución.

[0087] La descripción de las leyes de los TFOs está recogida en Maher III, L. J., et al., Science (1989) 245:725-730; Moser, H. E., et al., Science (1987)238:645-630; Beal, P. A., et al., Science (1991) 251:1360-1363; Cooney, M., et al., Science(1988)241:456-459; y Hogan, M. E., et al., EP Publication 375408. La modificación de oligonucleótidos, así como la introducción de intercaladores y sustituciones de esqueleto y la optimización de las condiciones de anclaje (pH y concentración de cationes), han servido de ayuda para superar obstáculos inherentes a la actividad TFO como el rechazo o la inestabilidad. Además, recientemente se ha demostrado que se puede sintetizar

oligonucleótidos con objetivo de secuencias específicas (para consultar un trabajo reciente, véase Seidman y Glazer (2003) J Clin Invest; 112:487-94).

[0088] En general, el oligonucleótido formador de tríplex presenta la correspondencia de secuencia:

5

oligo 3'--A G G T
 dúplex 5'--A G C T
 dúplex 3'--T C G A

[0089] Sin embargo, se ha demostrado que los tripletes A-AT y G-GC presentan la mayor estabilidad de triple hélice (Reither y Jeltsch (2002), BMC Biochem, Sept12, Epub). Los mismos autores han demostrado que los TFOs diseñados de acuerdo con esta regla A-AT y G-GC no forman tríplex no específicos, lo cual indica que la formación de tríplex realmente es específica para una determinada secuencia.

[0090] Así, para cualquier secuencia dada en la región regulatoria se puede especificar una secuencia formadora de tríplex concreta. Preferiblemente, los oligonucleótidos formadores de tríplex se contendrán un mínimo de 15 nucleótidos de longitud, más preferiblemente 25 y, en el mejor de los casos, 30 o más, además de entre 50 y 100 bp.

[0091] La transfección de células (por ejemplo, por medio de liposomas catiónicos) con TFOs y la consiguiente formación de una estructura de triple hélice con objetivo de DNA induce cambios estéricos y funcionales, y bloquea el inicio de la transcripción y la elongación, lo cual permite introducir los cambios deseados en la secuencia del DNA endógeno y tiene como resultado la disminución específica de la expresión del gen. Entre los ejemplos de supresión de la expresión génica en células tratadas con TFOs se incluyen los genes eliminarios supFG1 episomal y genes HPRT endógenos en células de mamíferos (Vasquez et al., Nucl Acids Res. (1999) 27:1176-81, y Puri, et al., J Biol Chem, (2001) 276:28991-98). Además, también se ha conseguido probar la disminución con especificidad de secuencia y objetivo de la expresión del factor de transcripción Ets2, que desempeña un papel importante en la etiología del cáncer de próstata (Carbone, et al., Nucl Acid Res.(2003) 31:833-43). Se ha obtenido resultados también con el gen pro-inflamatorio ICAM-1 (Besch et al., J Biol Chem, (2002) 277:32473-79). Además, Vuyisich y Beal recientemente demostraron que los TFOs para secuencia específica se pueden unir al dsRNA, inhibiendo la actividad de las enzimas dependientes del dsRNA, como las cinasas dependientes de RNA (Vuyisich and Beal, Nuc. Acids Res (2000) ;28:2369-74). Acids Res (2000) ;28:2369-74).

[0092] Por otra parte, los TFOs diseñados de acuerdo con los principios expuestos anteriormente pueden inducir una mutagénesis directa con capacidad para reparar el DNA, de forma que no sólo pueden disminuir los niveles de genes endógenos, sino también elevarlos [Seidman and Glazer, J Clin Invest (2003) 112:487-94]. Las solicitudes de patentes estadounidenses números 2003 017068 y 2003 0096980 to Froehler et al., y 2002 0128218 y 2002 0123476 de Emanuele et al., y la patente estadounidense número 5.721.138 de Lawn, proporcionan descripciones detalladas para el diseño, la síntesis y la administración de TFOs efectivos. Las 2003 017068 y 2003 0096980 de Froehler et al., y 2002 0128218 y 2002 0123476 de Emanuele et al., y la patente estadounidense número 5.721.138 de Lawn.

[0093] Se podrá apreciar que los agentes ácidos nucleicos con capacidad para hibridar H19 mRNA pueden disminuir una actividad y así evitar que el H19 mRNA se unan a otro agente más abajo.

[0094] Como se menciona anteriormente, los agentes ácidos nucleicos de la presente invención (por ejemplo, la molécula de siRNA como las establecidas con número de identificación de secuencia: 1, 2, 3 o 4) pueden expresarse en células.

[0095] Se podrá apreciar, igualmente, que los agentes de la presente invención pueden expresarse directamente en el sujeto (por ejemplo, en terapia génica in vivo) o en ex vivo en un sistema celular (autologus o no autologus) para después ser administradas al sujeto. Para expresar dicho agente (por ejemplo, para producir una molécula de RNA) en células de mamíferos, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los agentes de la presente invención estará preferiblemente ligada a un construido de ácido nucleico apropiado para la expresión en células de mamíferos. Dicho construido de ácido nucleico contendrá una secuencia promotora para dirigir la transcripción de la secuencia del polinucleótido en la célula de forma constitutiva o inducible.

[0096] Los promotores constitutivos adecuados para su uso en la presente invención son aquellas secuencias promotoras activas bajo casi cualquier condición ambiental y en la mayoría de tipos celulares, como los citomegalovirus (CMV en sus siglas en inglés) y el virus del sarcoma de Rous (RSV en sus siglas en inglés). Los promotores inducibles apropiados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, promotores inducibles de tetraciclina (Zabala M, et al., Cancer Res. 2004, 64(8): 2799-804).

[0097] El construido de ácido nucleico (al que también nos referimos en la presente invención con el término "vector de expresión") contiene varias secuencias que hagan adecuado a dicho vector para la replicación e integración en células procariotas, eucariotas, o ambas, preferiblemente (por ejemplo, vectores lanzadera). Además, los vectores

65

típicamente usados en clonación también podrían contener una secuencia de iniciación de transcripción y translación, una secuencia de término de transcripción y translación y una señal de poliadenilación.

- 5 **[0098]** Los promotores para células eucariotas contienen tradicionalmente dos tipos de secuencias de reconocimiento, la caja TATA y componentes promotores. Se cree que la caja TATA, que se sitúa entre los pares de bases 25-30 por encima del sitio de iniciación de la transcripción, está involucrada en dirigir la polimerasa RNA para comenzar la síntesis de RNA. Los otros componentes promotores determinan el índice en el que se inicia la transcripción.
- 10 **[0099]** Preferiblemente, el construido de ácido nucleico de la presente invención utilizará un promotor activo para una población celular transformada específica. Entre los ejemplos de promotores específicos para un tipo de célula o un tipo de tejido se incluyen la albúmina específica para el hígado [Pinkert et al., (1987) *Genes Dev.* 1:268-277], los promotores específicos para la linfa [Calame et al., (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275]; promotores específicos para los receptores de células T [Winoto et al., (1989) *EMBO J.* 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) *Cell* 33729-740], promotores específicos para las neuronas como los promotores de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477], promotores específicos para el páncreas [Edlunch et al. (1985) *Science* 230:912-916] o promotores específicos para las glándulas mamarias como el promotor de la proteína del suero de la leche (la patente estadounidense número 4.873.316 y Solicitud de Patente Europea número 264.166).
- 15 **[0100]** Los elementos de mejora pueden estimular la transcripción de hasta 1.000 pliegues de homólogos unidos o promotores heterólogos. Los elementos de mejora se encuentran activos cuando se colocan en el sitio de iniciación de la transcripción, downstream or upstream. Muchos elementos de mejora derivados de virus contienen un amplio rango de huéspedes y se encuentran activos en diversos tejidos. Por ejemplo, el elemento de mejora del gen temprano SV40 es adecuado para muchos tipos celulares. Otras combinaciones de elementos de mejora/promotores que son adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen derivados del virus polio, citomegalovirus (CMV en sus siglas en inglés) humano o murino, la repetición a largo plazo de varios retrovirus como el virus de la leucemia murina, el virus del sarcoma de Rous o murino o el VIH. Véase, *Enhancers and Eukaryotic Expression*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983.
- 20 **[0101]** En la construcción del vector de expresión, el promotor se situará preferiblemente a aproximadamente la misma distancia del sitio de iniciación de la transcripción heterólogo que del sitio de iniciación de la transcripción natural. Como es bien sabido por los expertos en el campo, es posible poner en práctica ciertas variaciones en la distancia sin que se pierda la función promotora.
- 25 **[102]** También se pueden añadir secuencias de poliadenilación al vector de expresión para aumentar la estabilidad del RNA [Soreq et al., 1974; *J. Mol. Biol.* 88: 233-45).
- 30 **[103]** Se necesitan dos elementos de secuencia distintos para una poliadenilación precisa y eficiente: secuencias ricas en GU o U que se encuentren más abajo del sitio de poliadenilación y una secuencia altamente conservada de seis nucleótidos, AAUAAA, localizada entre los nucleótidos 11-30 más arriba. Las señales de término y poliadenilación adecuadas para la presente invención incluyen las derivadas de SV40.
- 35 **[0104]** Además de los elementos ya descritos, el vector de expresión de la presente invención podría contener además otros elementos especializados que contribuyan a aumentar el nivel de expresión de los ácidos nucleicos clonados o bien a facilitar la identificación de las células portadoras del DNA recombinante. Varios virus de animales, por ejemplo, contienen secuencias de DNA que promueven una replicación adicional de los cromosomas del genoma del virus en tipos celulares permisivos. Los plásmidos que contienen dichos replicadores de los virus se replican episomal si se dan los factores adecuados por parte de los genes que se encuentran tanto en los plásmidos como en el genoma de la célula huésped.
- 40 **[105]** El vector podrá incluir un replicador eucariótico o no. En caso de incluirlo, dicho vector puede ampliarse en células eucariotas por medio de un marcador seleccionable adecuado. Si el vector no contiene replicador eucariótico, no será posible la ampliación episomal. En ese caso, el DNA recombinante se integra en el genoma de la célula genéticamente modificadas, en la que el promotor dirige la expresión del ácido nucleico deseado.
- 45 **[0106]** Entre los ejemplos de vectores de expresión se incluyen, entre otros, el pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que se pueden obtener en Invitrogen, pCI, que se puede obtener en Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV, que se puede obtener en Strategene, pTRES, disponible en Clontech, y derivados.
- 50 **[0107]** También se puede utilizar vectores de expresión que contienen elementos de regulación de virus eucariotas como los retrovirus. Los vectores SV40 incluyen el pSVT7 y el pMT2. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen el pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus Epstein Bar incluyen el pHEBO y el p205. Otros ejemplos de vectores son el pMSG, pAV009/A +, pMTO10/A +, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano SV40, el promotor tardío de SV-40, el promotor de metalotioneína, promotores de virus de tumores mamarios en murinos, el promotor del virus
- 55 **[0107]** También se puede utilizar vectores de expresión que contienen elementos de regulación de virus eucariotas como los retrovirus. Los vectores SV40 incluyen el pSVT7 y el pMT2. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen el pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus Epstein Bar incluyen el pHEBO y el p205. Otros ejemplos de vectores son el pMSG, pAV009/A +, pMTO10/A +, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano SV40, el promotor tardío de SV-40, el promotor de metalotioneína, promotores de virus de tumores mamarios en murinos, el promotor del virus
- 60 **[0107]** También se puede utilizar vectores de expresión que contienen elementos de regulación de virus eucariotas como los retrovirus. Los vectores SV40 incluyen el pSVT7 y el pMT2. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen el pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus Epstein Bar incluyen el pHEBO y el p205. Otros ejemplos de vectores son el pMSG, pAV009/A +, pMTO10/A +, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano SV40, el promotor tardío de SV-40, el promotor de metalotioneína, promotores de virus de tumores mamarios en murinos, el promotor del virus
- 65 **[0107]** También se puede utilizar vectores de expresión que contienen elementos de regulación de virus eucariotas como los retrovirus. Los vectores SV40 incluyen el pSVT7 y el pMT2. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen el pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus Epstein Bar incluyen el pHEBO y el p205. Otros ejemplos de vectores son el pMSG, pAV009/A +, pMTO10/A +, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano SV40, el promotor tardío de SV-40, el promotor de metalotioneína, promotores de virus de tumores mamarios en murinos, el promotor del virus

del sarcoma de Rous, promotores de polihedrina y otros promotores que presenten expresión efectiva en células eucariotas.

5 **[0108]** Como se describe anteriormente, los virus son agentes infecciosos altamente especializados que han evolucionado, en muchos de los casos, para esquivar los mecanismos de defensa de las células huésped. Tradicionalmente, los virus infectan y se propagan en tipos celulares específicos. La especificidad de los vectores de los virus se basa en su especificidad natural para tener tipos celulares predeterminados como objetivos, de esta forma, introducen genes recombinantes en la célula infectada. Así, el tipo de vector que contempla la presente invención también dependerá del tipo de célula que se transforme. La capacidad para seleccionar vectores adecuados según el tipo de célula transformada es normal entre los expertos en el campo, por lo tanto no se considera necesario proporcionar una descripción general de las consideraciones a tener en cuenta a la hora de seleccionar dichos vectores en el presente documento. Por ejemplo, las células de la médula ósea se pueden convertir en objetivo por medio del virus de leucemia en células T tipo 1 (HTLV-I, en sus siglas en inglés). De la misma forma, para convertir en objetivo las células de riñón se puede utilizar un promotor heterólogo presente en el baculovirus Autographa californica nucleopolyhedrovirus (AcMNPV en sus siglas en inglés), tal y como se describe en Liang CY et al., 2004 (Arch Virol. 149: 51-60).

20 **[0109]** Los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión in vivo de los agentes encargados de la disminución de los niveles de H19 de la presente invención, ya que proporcionan diferentes ventajas, como la infección lateral y la especificidad de objetivo. La infección lateral es inherente al ciclo vital de los retrovirus, por ejemplo. Se trata de un proceso por el cual una única célula infectada produce varios viriones de progenie que emergen de esta e infectan a las células contiguas. De esta forma, se consigue infectar rápidamente una zona que previamente no estaba infectada, en su mayor parte, por las partículas virales originales. Este tipo de infección es diferente de la infección vertical, en la que el agente infeccioso se extiende sólo por medio de células hijas. También se puede producir vectores virales que no puedan expandirse lateralmente. Esta característica puede ser de utilidad cuando el objetivo es introducir el gen especificado únicamente en una serie de células objetivo localizadas.

30 **[0110]** Se pueden utilizar distintos métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención en células. Por ejemplo, se puede recurrir a los métodos generales descritos en Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, But-terworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluir, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación o infección tanto estable como transitoria por medio de vectores de virus recombinantes. Véase también las patentes estadounidenses números 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.

40 **[0111]** La introducción de ácidos nucleicos por infección vírica presenta varias ventajas sobre los demás métodos mencionados, como la lipofección o la electroporación, ya que tiene una mayor eficiencia de transfección debido a la propia naturaleza infecciosa de los virus.

45 **[0112]** Las técnicas de transferencia in vivo de ácido nucleico preferidas actualmente para la presente invención incluyen la transfección con construidos víricos o no víricos, como los adenovirus, los lentivirus, el virus Herpes simplex I, o virus adeno-asociados (AAV en sus siglas en inglés) y sistemas de base lipídica. Entre los lípidos útiles para la transferencia del gen por medio de lípidos son, entre otros, el DOTMA, el DOPE y el DC-Chol [Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)]. Los construidos más preferidos para la utilización en terapia génica son los virus, en concreto, los adenovirus, AAV, lentivirus o retrovirus. Un construido vírico como un retrovirus incluirá al menos un elemento promotor/de mejora de la transcripción o un elemento(s) que defina el locus, u otros elementos que controlen la expresión del gen por otros medios, como la variante alternativa de splicing, la exportación del núcleo de RNA o la modificación post-translativa del mensajero. Dichos construidos de vectores también incluyen un paquete de señal, repeticiones de terminales largas (Lars en sus siglas en inglés) o fragmentos de estas y sitios primarios de unión de cadena negativa o positiva adecuados para el virus utilizado, a menos que ya se encuentre incluido dentro del construido viral. El construido también podría incluir una señal que dirija la poliadenilación, así como uno o más sitios de restricción. A modo de ejemplo, diremos que dichos construidos incluirían un LTR 5', un sitio de unión tRNA, un paquete de señal, el inicio de la síntesis de una segunda cadena de DNA y un LTR 3' o un fragmento de este. Se pueden utilizar otros vectores no víricos, como lípidos catiónicos, polilisinas o dendrímeros.

60 **[0113]** Además de contener los elementos necesarios para la transcripción de la secuencia de codificación insertada, el construido de expresión de la presente invención también puede incluir secuencias genéticamente modificadas para mejorar la estabilidad, la producción, la purificación, el rendimiento o la toxicidad del RNA expresado.

65 **[0114]** Como se ha mencionado anteriormente, los agentes con capacidad para disminuir el H19 mRNA se pueden utilizar en tratamientos contra el cáncer tanto unilateralmente (por ejemplo, los siRNAs de la presente invención), como en combinación con otros tratamientos establecidos o experimentales para dicha enfermedad. Los inventores

de la presente proponen, asimismo, que los agentes con capacidad para disminuir el H19 mRNA se utilicen en sinergia con otros métodos o compuestos terapéuticos adicionales, para posibilitar una reducción significativa de las dosis clínicamente efectivas de dichos tratamientos, lo cual contribuiría a reducir los efectos secundarios, en ocasiones altamente negativos, así como el elevado coste, del tratamiento. Esto podría resultar especialmente importante en el tratamiento de tumores sólidos asociados a regiones con hipoxia en los que la quimioterapia y la radioterapia no son efectivas.

[0115] Los agentes de la presente invención podrían administrarse antes, durante, o después de la terapia para el cáncer.

[0116] En adelante, la expresión "terapia para el cáncer" hace referencia a cualquier tratamiento enfocado a prevenir, paliar o disminuir los síntomas asociados a una enfermedad cancerosa.

[0117] Las terapias para el tratamiento del cáncer que son susceptibles de combinarse con los agentes de la presente invención o codificadores de polinucleótidos similares incluyen, sin que ello suponga una restricción, la quimioterapia, la radioterapia, la fototerapia y la fototerapia dinámica, intervenciones quirúrgicas, terapias nutricionales, terapias ablativas, una combinación de radioterapia y quimioterapia, braquioterapia, terapia por haces de protones, inmunoterapia, terapia celular y terapia radioquirúrgica con haces de fotones. También se incluyen entre las terapias para el tratamiento del cáncer que se pueden combinar con los agentes de la presente invención la administración de agentes nucleótidos capaces de regular los genes responsables en la vía reguladora del cáncer o de la angiogénesis.

[0118] Se puede administrar conjuntamente con los compuestos de la presente invención, también, fármacos para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) entre los que se incluyen, sin presentar limitaciones, los siguientes: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adriamicina; adozelesina; aldesleukin; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozola; antramycin; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastata; benzodepa; bicalutamida; hidrocloreuro de bisantrene; dimesilato de bisnafide; bizelesina; sulfato de leomicina; brequinar sodio; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; Carbetimer; carboplatina; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatina; cladribino; mesilato de crisnatol; c iclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; Dexormaplatina; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflomitina; elsamitrucina; enloplatina; enpromato; epipropidina; hidrocloreuro de epirubicina; erbulozola; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazola; etoposida; fosfato de etoposida; etoprina; clorhidrato de fadrozola; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; fluorocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; interferon Alfa-2a; interferon Alfa-2b; interferon Alfa-n1; interferon Alfa-n3; interferon Beta- I a; interferon Gamma- I b; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozola; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrone; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalano; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexateo sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogillina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatina; oxisuran; paclitaxel; pegaspargaso; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipo-bromano; pipsulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfmier sódico; porfiomicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogetimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; sparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatina; estreptonigrina; estrepto-zocina; sulofenuro; talisomicina; taxol; tecogalano sódico; tegafuro; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; teniposida; teroxirona; testolactoe; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiozofurina; tirapazamina; clorhidrato de topotecano; citrato de toremifena; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; trimetrexato glucuronateo; triptorelina; clorhidrato tubulozol; uramustina; uredepq; vaporetidq; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinapidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; vinorelbina tartrate; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozola; zeniplatina; zinostatina; clorhidrato de zorubicina. Otros agentes antineoplásticos incluyen los especificados en el capítulo 52 de Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner), y la introducción, páginas 1202-1263, de la obra de Goodman y Gilman "The Phar-macological Basis of Therapeutics", octava edición, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division).

[0119] Los agentes de la presente invención pueden presentarse en un dispositivo en paquete o dispensador, si se desea. Se puede utilizar un kit aprobado por la FDA, que podría contener una o más dosis de las formas que contienen los agentes de la presente invención. Los agentes podrían coformularse en un único paquete con el agente anticancerígeno adicional, o se puede formular separadamente los agentes del agente anticancerígeno adicional en un paquete separado. El paquete podría contener, por ejemplo, láminas de metal o plástico, como un envase. El dispositivo en paquete o dispensador podría venir acompañado de instrucciones para su administración. El paquete o dispensador también podría venir acompañado de avisos asociados al contenedor en la forma preescrita por la agencia gubernamental que regula su manufactura, el uso o la venta de compuestos farmacéuticos, dichos avisos reflejarán la aprobación de la agencia de la forma de la administración humana o veterinaria. Dicho

aviso podría ser, por ejemplo, para el etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA en sus siglas en inglés) para la prescripción de fármacos o la administración de un producto aprobado. Las composiciones que contengan los agentes de la invención formulados en un portador farmacológicamente compatible también podrán prepararse, envasarse en un contenedor adecuado, y etiquetarse para el tratamiento del cáncer.

[0120] Los agentes de la presente invención pueden ser administrados a un sujeto per se, o en un compuesto farmacológico en el que estén combinados con portadores o excipientes adecuados.

[0121] En adelante, la expresión "compuesto farmacológico" hace referencia a una preparación con uno o más principios activos descritos en el presente documento, en combinación con otros compuestos químicos, como portadores o excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito del compuesto farmacológico es facilitar la administración de un compuesto en un organismo.

[0122] En adelante, la expresión "principios activos" hace referencia a un agente con efecto anti cancerígeno.

[0123] En adelante, las expresiones "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacológicamente aceptable" pueden utilizarse indistintamente para referirse al portador o diluyente que no cause irritación significativa en un organismo o no inhibir la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Estas expresiones incluyen también agentes adyuvantes.

[0124] En adelante, el término "excipiente" hace referencia a una sustancia inerte añadida al compuesto farmacológico con el objetivo de facilitar la administración del principio activo. Ejemplos de esto son, entre otros, son el carbonato cálcico, el fosfato de calcio, varios azúcares y almidones, derivados de la celulosa, gelatinas, aceites vegetales y glicoles de polietileno.

[0125] Las técnicas para la formulación y la administración de los fármacos pueden consultarse en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA.

[0126] Las rutas de administración apropiadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosa, sobre todo transnasal, instestinal o parenteral, incluida la intramuscular, subcutánea e inyecciones intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

[0127] Otra opción es administrar el compuestos farmacológico de forma localizada en lugar de sistemática, por ejemplo, inyectando el compuesto farmacológico directamente en el tumor (esto es, in situ).

[0128] Los compuestos farmacológicos de la presente invención pueden producirse poniendo en práctica procesos ampliamente conocidos dentro del campo, por ejemplo, por mezclado convencional, disolución, granulado, elaboración de grageas, reducción a polvo, emulsión, encapsulado, o procesos de oclusión y liofilizado.

[0129] Así, los compuestos farmacológicos para su utilización de acuerdo con la presente invención pueden formularse de forma convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que contengan excipientes y sustancias auxiliares que faciliten el procesamiento de los principio activos en preparaciones aptas para la utilización desde el punto de vista farmacológico. La ruta de administración elegida será la que determine la formulación más adecuada.

[0130] En el caso de administración por inyección, los principios activos del compuesto farmacológico se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente compatibles con reguladores como la solución de Hank o soluciones salinas fisiológicas. Para la administración transmucosa, se debe utilizar agentes penetrantes apropiados para la barrera que debe permear el compuesto a la hora de de formularlo. Dichos agentes penetrantes son ampliamente conocidos dentro del campo.

[0131] Para la administración oral, el compuesto farmacológico se puede formular para combinar los principios activos con portadores aceptables ampliamente conocidos. Dichos portadores permiten que los compuestos farmacológicos se formen para formar tabletas, pastillas, drageas, cápsulas, líquidos, geles, siropes, lechadas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por parte del paciente. Las preparaciones farmacológicas para el uso oral se pueden formular haciendo uso de un excipiente sólido, la mezcla resultante puede también molerse hasta conseguir un polvo; a continuación, se procesa la mezcla de gránulos, añadiendo primero elementos auxiliares apropiados, si se desea, para obtener el núcleo de las tabletas o grageas. Los excipientes más apropiados serán, en concreto, elementos de relleno como pueden ser azúcares (lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol), preparaciones de celulosa, como el almidón de maíz, de trigo, de arroz o de patata, gelatinas, gomas tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o otros polímeros fisiológicamente aceptables como la polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se puede añadir agentes desintegrantes como polivinilpirrolidona de enlace cruzado, agar, ácido gálico o una sal como el alginato de sodio.

- 5 **[0132]** Los núcleos de las grageas se recubrirán adecuadamente. Para tal efecto, se puede utilizar soluciones de azúcar concentrada que, opcionalmente, podrían contener goma arábiga, talco, polivinil pirrolidone, gel carbopol, glicol polietileno, dióxido de titanio, soluciones de lacado y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes apropiados. Se podrá añadir tintes o pigmentos al recubrimiento de tabletas o grageas para facilitar su identificación o para diferenciar distintas dosis de los compuestos activos.
- 10 **[0133]** Los compuestos farmacológicos que pueden usarse oralmente incluyen cápsulas push-fit elaboradas a partir de gelatina, así como cápsulas selladas elaboradas a partir de gelatina y un elemento plastificantes como glicerol o sorbitol. Las cápsulas push-fit podrán contener ingredientes activos combinados con elementos de relleno, como lactosa, elementos de unión, como almidones, lubricantes como talco o estereato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, se puede disolver o suspender los ingredientes activos en líquidos apropiados, como aceites grasos, parafina líquida o glicoles de polietileno líquidos. Se puede añadir estabilizadores también. Todas las formulaciones para administración oral deben presentarse en dosis adecuadas en función de la vía de administración.
- 15 **[0134]** Para administración bucal, las composiciones pueden formularse en forma de tabletas o enjuagues formulados de forma convencional.
- 20 **[0135]** Para la administración nasal por inhalación, los principios activos de acuerdo con la presente invención se pueden formular en forma de un spray de aerosol en un contenedor presurizado o nebulizador con el uso de un propelante adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de utilizar un aerosol presurizado, la dosis debe determinarse por medio de una válvula que proporcionará una dosis exacta del compuesto. Las cápsulas o cartuchos de gelatina, por ejemplo, para utilizar con dispensador se pueden formular con una mezcla de polvos del compuesto y una base en polvo adecuada, como lactosa o almidón.
- 25 **[0136]** Los compuestos farmacológicos descritos en este documento se pueden formular también para administración parenteral, por ejemplo, por medio de inyecciones de bolo o inoculación continua. Las formulaciones para inyección se presentarán por unidades de dosis, en ampollas o contenedores multidosis, por ejemplo, pudiendo también incluir un conservante. Las composiciones se pueden encontrar en suspensión, solución o emulsión en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes suspensores, estabilizadores o dispersantes.
- 30 **[0137]** Los compuestos farmacológicos para administración parenteral incluyen soluciones acuosas del preparado activo en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los principios activos pueden prepararse con base oleosa o acuosa apropiada para suspensiones de inyección. Los vehículos o solventes lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos como el aceite de sésamo, o ácidos grasos sintéticos como el etil oleato, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas podrán contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrán. La suspensión podrá contener, de forma opcional, agentes o estabilizadores adecuados para aumentar la solubilidad de los principios activos de forma que se consigan soluciones con alta concentraciones del preparado.
- 35 **[0138]** Otra alternativa es presentar el principio activo en forma de polvo para su reconstitución por medio de un vehículo adecuado antes de su uso, por ejemplo, una solución acuosa estéril libre de pirógenos.
- 40 **[0139]** El compuesto farmacológico de la presente invención también puede formularse para su uso en compuestos rectales como supositorios o enemas de retención por medio de bases convencionales de supositorios como la manteca de cacao u otros glicéridos, por ejemplo.
- 45 **[0140]** Los compuestos farmacológicos apropiados para usar en el contexto de la presente invención incluyen los compuestos de principios activos en cantidades efectivas para conseguir el efecto deseado presentados en este documento. Más concretamente, una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico se refiere a una cantidad de principios activos (construido de ácido nucleico) con capacidad para prevenir, paliar o mejorar los síntomas de una enfermedad (por ejemplo, isquemia) o prolongar el tiempo de vida del sujeto sometido a tratamiento.
- 50 **[0141]** Los expertos en la materia podrán determinar dichas cantidades efectivas gracias a sus conocimientos y con la ayuda de la información detallada proporcionada en el presente documento.
- 55 **[0142]** Para cualquier preparación utilizada de acuerdo con los métodos de la invención, la cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico será aquella dosis que se determine previamente en los ensayos con cultivos celulares in vitro. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos de animales para conseguir así la concentración o cantidad deseada. Dicha información puede servir de base para determinar de forma más certera las dosis necesarias en humanos.
- 60 **[0143]** La toxicidad y eficacia terapéutica de los principios activos aquí descritos puede determinarse por medio de procedimientos farmacológicos in vitro estándar o en cultivos celulares y experimentación con animales. Los datos obtenidos de dichos estudios con cultivos celulares in vitro o con animales se utilizarán para formular el rango de la
- 65

dosis necesaria para uso en humanos. La dosis podrá variar dependiendo de la forma de esta y de la vía de administración utilizada. El especialista deberá escoger, en función del estado de cada paciente, la vía de administración y la dosis más apropiada en cada caso. (Véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1, pág. 1). La cantidad y el rango de la dosis se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles del principio activo en plasma o cerebro suficientes para inducir o inhibir el efecto biológico buscado (concentración mínima efectiva, CME). La CME es susceptible de variar para cada preparado, pero esto se puede calcular con los resultados del ensayo in vitro. Las dosis necesarias para alcanzar la CME dependerán de características individuales, así como de la vía de administración. Los estudios de detección también son de utilidad para determinar las concentraciones de plasma.

[0144] Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta ante el tratamiento de la enfermedad en cuestión, se elegirá la administración de una única dosis o de dosis múltiples, de forma que el tratamiento podría durar desde algunos días hasta varias semanas hasta que la enfermedad remita o disminuya en gravedad.

[0145] La cantidad de compuesto que se administre al paciente dependerá, evidentemente, del sujeto en cuestión, de la gravedad de sus estado, de la vía de administración y del juicio del especialista que lleve su caso, etc.

[0146] Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un dispositivo de paquete o dispensador, como por ejemplo un kit aprobado por la FDA, que podría contener una o más unidades del preparado con el principio activo. El paquete podría contener, por ejemplo, láminas de metal o plástico, como un envase. El dispositivo en paquete o dispensador podría venir acompañado de instrucciones para su administración. El paquete o dispensador también puede suministrarse con un aviso asociado al recipiente contenedor en la forma que dictamine la agencia gubernamental encargada de regular la fabricación, el uso o la venta de fármacos. Dicha nota reflejaría la aprobación por parte de la agencia de la forma de los compuestos o de la administración en pacientes humanos o veterinarios. Dicho aviso podría ser, por ejemplo, para el etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA en sus siglas en inglés) para la prescripción de fármacos o la administración de un producto aprobado. También se podrá elaborar compuestos que contengan un preparado de acuerdo con la invención en un portador farmacológico compatible. Después se colocará en un recipiente apropiado y será etiquetado para el tratamiento de la enfermedad indicada, como se especifica anteriormente.

[0147] Se prevé que durante el tiempo de validez de esta patente, se desarrollen numerosas terapias para el cáncer de gran relevancia, por lo que el término terapia para el cáncer en este documento hace referencia a todas las nuevas tecnologías pertinentes que puedan aparecer.

[0148] En adelante, el término "aproximadamente" hace referencia a los valores comprendidos entre 6 y 10%.

[0149] Cualquier experto en el campo que abarca la presente invención podrá inferir objetos, ventajas y características novedosas en relación con la invención, al examinar los ejemplos detallados a continuación, que no suponen en ningún caso una limitación. Además, cada una de las varias posibles formas de poner en práctica la invención y de sus varios aspectos descritos anteriormente y reivindicados en el apartado Reivindicaciones puede apoyarse en los datos de los experimentos presentados en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

[0150] A continuación se hará referencia a los siguientes ejemplos, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran la presente invención de forma que no suponen una limitación.

[0151] De forma general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio puestos en práctica en relación con la presente invención incluyen técnicas de recombinación molecular, bioquímica, microbiológica y de ADN. Dichas técnicas están explicadas ampliamente en la literatura del campo de conocimiento. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Geno Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); los métodos establecidos en las patentes estadounidenses U.S. Pat. números 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 and 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); además, la literatura y patentes del campo también describen ampliamente los inmunoensayos, véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL

Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

5 [0152] A lo largo de este documento se proporcionan más referencias generales. Los procedimientos contenidos en el presente documento son del conocimiento de todos los expertos en el campo y se proporcionan explicaciones sobre ellos para comodidad del lector, únicamente.

10 EJEMPLO 1

Detección de una variante alternativa de splicing del H19 en especímenes de embriones y placentas humanos.

15 [0153] Los siguientes experimentos se llevaron a cabo con el objetivo de dilucidar si las variantes de splicing del H19 se limitaban a un tipo particular de células.

MATERIALES Y MÉTODOS

20 [0154] **Cultivo celular:** Todas las líneas celulares de carcinoma humano utilizadas en este estudio se obtuvieron a través de la colección de la Colección de Cultivos Tipo de EE.UU. (Manassas, VA) y se mantuvieron en DMEM-F12 (1:1), un medio que contenía un 10% de suero fetal bovino (desactivado a 55° C durante 30 minutos), 25mM de HEPES (pH 7,4), penicilina (180 unidades/ml), estreptomina (100mg/ml) y anfotericina B (0,2 mg/ml). Se sembró un total aproximado de 4x10⁴ células/cm² en portacultivos de poliestireno (NUNC). Cada 4 días, se tripsinizaba las
25 células con una solución de tripsina-EDTA al 0,05% (Biet Haemek) durante 10 minutos. Después se volvían a sembrar con las mismas densidades iniciales.

[0155] **Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR):** Se extrajo de los tejidos y de las líneas celulares cultivadas usando el TRI REACTIVO (Sigma) el total de ARN, de acuerdo con las instrucciones de manufactura. A continuación, este se trató con DNasa I para así excluir posible contaminación genómica por ADN, como se ha descrito anteriormente (Ayesh and Matouk et al, 2002, Mol Ther 7, 535-541). Se llevó a cabo la síntesis de cADN por medio de un iniciador p(dT) 15 (Roche, Alemania), para iniciar la transcripción reversa de 5 mg de ARN total con 400 unidades de transcriptasa reserva (Gibco BRL), de acuerdo con las instrucciones de manufactura. Se llevó a cabo la reacción PCR en presencia de Diaza dGTP (Roche, Alemania), con polimerasa Taq (Takara, Otsu, Japón) durante 40 ciclos (94 °C durante 1 min, 58 °C durante 30s y 72 °C durante 40s). A continuación, se procedió a un ciclo de 94°C durante 5 minutos y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Los iniciadores utilizados en la reacción fueron (5'-AGGAGCACCTTGGACATCTG-3') (número de identificación de secuencia: 8) y (5'-CCCCTGTGCCTGCTACTAAA-3') (número de identificación de secuencia: 9) y las bases 117 y 816 hacia abajo presentaron transcripción de H19 en el sitio de iniciación, respectivamente (Brannan et al, 1990, Mol Cell Biol 10, 28-36). La posición de los iniciadores se muestra en la figura 1A. Los productos de la reacción PCR se incorporaron a geles tintados de bromuro de etidio.

[0156] **Síntesis de la sonda:** Los productos PCR obtenidos de los tejidos que presentaron una banda menor se purificaron del gel utilizando GFX™ PCR, ADN y un gel del kit de purificación de bandas. A continuación se clonaron en un vector T-easy® (Promega, EE.UU.). Se verificó la orientación del producto insertado mediante análisis de restricción enzimáticos, y, de la misma forma, se sintetizó la cadena anti-sentido por medio de dioxigenina UTP siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche, Alemania). La sonda resultante se trató con dos unidades de DNasa I libres de RNasa, se granuló y se volvió a poner en suspensión en un volumen apropiado de agua bidestilada tratada con DEPC. El volumen de la sonda sintetizada se analizó en un minigel de agarosa desnaturante al 4%, y se determinó su eficiencia de marcado por medio de un análisis de hibridación en mancha con anticuerpo de dioxigenina (no se muestran los datos).

[0157] **Ensayo de protección RNasa:** Se utilizó diferentes concentraciones de ARN de placenta en el tercer trimestre (que presentaba la variante de separación alternativa en el ensayo de RT-PCR) para el estudio de protección RNasa. Se hibridó 600 pg de ARN total (tratado con DNasa I) de placenta de tercer trimestre en sonda (dig-labeled) de 10mg y ARN de levadura en concentraciones iguales a la mayor concentración de ARN utilizada a 42 °C durante 16 horas. A continuación, se digirió con RNasa A/ y RNasa T1, de acuerdo con las instrucciones del kit RPA II™ (Ambion). Los fragmentos de RNA protegidos de la digestión con RNasa se separaron después por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 5% (con 8 M de urea) y se detectaron usando el kit de detección CDP Star Detection Kit (Roche, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0158] **Secuenciación del DNA:** Se llevó a cabo reacciones de secuenciación usando el kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystem).

RESULTADOS

[0159] Se encontró una variante alternativa de splicing del H19 presente en tejidos embrionarios y de la placenta, pero no en las líneas celulares de carcinoma ni en sujetos pacientes de cáncer, tal y como demostró el análisis RT-PCR (figuras 1B-D) y el ensayo de protección RNasa (figura 1E). Los estudios de secuenciación mostraron que la variante alternativa de splicing tenía una longitud de 344bp y le faltaba parte del exón 1 que se entiende desde 252 hasta 588 del sitio de iniciación de la transcripción (figura 1F) en comparación con la transcripción conocida para el H19 (GenBank Accession No. M32053).

EJEMPLO 2***El CoCl2 aumenta ligeramente la expresión del gen H19***

[0160] Se sabe que varios genes cuyos niveles aumentan en presencia del H19 RNA también son inducidos en condiciones de hipoxia (Ayesh and Matouk et al, 2002, Mol Carcinog 35, 63-74). También se ha afirmado que se ha detectado H19 RNA en tejido sinovial de artritis reumatoide (Stuhlmuller et al, 2003, Am J Pathol 163, 901-911). La presencia de angiogénesis extensiva suele asociarse con la artritis reumatoide debido a las condiciones de hipoxia y al estrés oxidativo, y en parte debido a la actividad metabólica del aumento de exudado de las células inflamatorias en la zona afectada.

[0161] Además, un estudio con enfoque proteómico ha revelado que la sobre-expresión del H19 en células epiteliales cancerosas de la mama en humanos transfectada de forma regular con DNA genómico con el gen H19 completo tiene la capacidad de regular al gen de la tioredoxina en una etapa post-transcriptiva. La tioredoxina es una proteína clave en la respuesta de estrés oxidativo y la biosíntesis de deoxinucleótidos (Lottin et al, 2002, Carcinogenesis 23, 1885-1895).

[0162] Además, se ha probado que muchos de los procesos que incluyen una invasión celular, incluyendo la implantación del blastocito y el desarrollo de la placenta, tienen lugar en entornos con bajo nivel oxígeno (Rodesch et al, 1992, Obstet Gynecol 80, 283-285). Estos dos procesos fisiológicos presentan un amplio aumento de la expresión del H19 (Ariel et al, 1994, Gynecol Oncol 53, 212-219).

[0163] En base a dicho razonamiento, se analizó el gen H19 para determinar su sensibilidad a condiciones de hipoxia.

MATERIALES Y MÉTODOS

[0164] Se cultivó células Hep3B en condiciones normales de cultivo durante 24 horas antes de la manipulación con CoCl₂. Se incubó las células con CoCl₂ (Sigma, Aldrich) durante otras 22 horas antes de la extracción de RNA.

[0165] Se llevó a cabo un análisis RT-PCR de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 1 utilizando los iniciadores 5'- CCG GCC TTC CTG AAC A-3' directa (número de identificación de secuencia: 10) y 5'- TTC CGA TGG TGT CTT TGA TGT-3' reversa (número de identificación de secuencia: 11).

RESULTADOS

[0166] La expresión del gen H19 aumenta moderadamente en células Hep3B (figuras 2A-B) en respuesta a la introducción de concentraciones cada vez mayores de CoCl₂ (de los 50 a los 40 μ M) analizado por medio de una reacción RT-PCR. Este aumento moderado en relación a un aumento significativo hacia condiciones reales de hipoxia indica que el HIF- α es responsable sólo en parte.

EJEMPLO 3***Se consigue disminuir los niveles de H19 RNA in vitro eficientemente utilizando diferentes dúplex de siRNA en cultivos en condiciones normales y condiciones similares a la hipoxia*****MATERIALES Y MÉTODOS**

[0167] **Preparación de los siRNAs:** Se sintetizaron cuatro siRNAs con objetivo de H19 humano y un siRNA para control negativo (con objetivo de luciferasa pGL3) (tal y como se describe en la Tabla 1, a continuación) en forma de dúplex listos para su uso de Prologo y diseñados siguiendo las recomendaciones con overhangs dTdT en cada cadena. La especificidad para el gen objetivo se evaluó en todas las cadenas usando el programa Blast del National Institutes of Health.

Tabla 1

Nombre del siRNA	Sentido de la secuencia	Ubicación	Número de identificación de la secuencia
H19 siRNA-1	5'-UAAGUCAUUUGCACUGGUUdTdT-3'	Exón 5	1
H19 siRNA-2	5'-GCAGGACAUGACAUGGUCCdTdT-3'	Exón 2	2
H19 siRNA-3	5'-CCAACAUCAAAAGACACCAUdTdT-3'	Exón 5	3
H19 siRNA-4	5'-CCAGGCAGAAAGAGCAAGAdTdT-3'	Exón 1	4
PG13 siRNA	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3'	Exón 1	5
GFP siRNA	5'- GCA AGC UGA CCC UGA AGU UCA U		6

5

[0168] Una vez recibidos, cada siRNA desecado por congelación se reconstituyó con agua libre de RNasa para preparar una solución de 50 pmol/ul. A continuación, se almacenaron en forma de alícuotas a -80 °C.

10 [0169] **Condiciones de cultivo celular y transfección de los siRNAs:** La transfección de los siRNAs se llevó a cabo por medio de lip-fectamina 2000 (Invitrogen, EE.UU.) en placas de 12 pocillos. El día anterior a la transfección, las células fueron tripsinizadas, contadas y sembradas (60.000/pocillo) en un medio con 1ml de DMEM sin antibióticos, de forma que confluyeron en un 50% el día de la transfección. Se incubó 3 ml de lipofectamina 2000 durante 15 minutos con 100 ml de medio OPTI-MEM libre de sérums (Invitrogen, EE.UU.). Esta mezcla se añadió a los dsRNA 100 pmol diluidos en 100 ml de medio OPTI-MEM libre de sérums y se mantuvo la formulación durante 20 minutos. Se aplicó 195 ml de dicha mezcla a las células Hep3B y UMUC3 y se incubaron durante otras 48 horas sin cambiar el medio. Para simular condiciones de hipoxia, se añadió un preparado de CoCl₂ a una concentración final de 100 mM 24 horas después de la transfección, y a continuación se incubó las células durante otras 22 horas antes de la extracción de RNA.

20 [0170] **Extracción de RNA y condiciones RT-PCR (siRNA):** Se llevó a cabo la transcripción total y reversa del RNA, tal y como se describe en el Ejemplo 1, salvo por que se utilizó un total de 1mg de RNA. Se llevó a cabo la reacción PCR para H19 en presencia de polimerasa Taq (Takara, Otsu, Japón) durante 34 ciclos (94 °C durante 30s, 58 °C durante 30s y 72 °C durante 30s), a continuación se llevó a cabo un ciclo a 94 °C durante 5 min y una extensión final de 5 min a 72°C, así como para GAPDH e histona. La secuencia inicial para GAP: directa 5'- GGC TCT CCA GAA CAT CAT CCC TGC-3' (número de identificación de secuencia: 12) y reversa GGG TGT CGC TGT TGA AGT CAG AGG-3' (número de identificación de secuencia: 13).

RESULTADOS

30 [0171] **Células Hep3B:** Se analizó la capacidad del siRNA para reducir el nivel endógeno de H19 RNA tanto en condiciones normales (figura 3A), como en condiciones similares a la hipoxia (figura 3B). Se detectó una gran supresión de la expresión del H19 en el análisis RT-PCR (48 horas después de la transfección) en cuatro siRNAs diferentes (1-4) con objetivo específico de H19 (figura 3A, líneas 2-5) o la cantidad equimolar de los cuatro siRNA (figura 3A, línea 6), pero con dúplex PG13 con objetivo de luciferasa sin relación con el H19 (figura 3A, línea 1), y el análisis de prueba (figura 3A, línea 7), respectivamente. Además, se analizó la capacidad de tres siRNAs diferentes (1, 3 y 4) para inhibir la expresión del gen H19 en condiciones similares a la hipoxia inducida por CoCl₂ (figuras 3B-C). A pesar de que se observó una inducción moderada del H19 RNA en la simulación con CoCl₂ (comparar la figura 3B línea 1 para la simulación de condiciones de hipoxia con la línea 5 para condiciones normales, ambos habiendo sido transfectados con dúplex PG13), se detectó una reducción muy significativa usando los tres siRNAs diferentes con objetivo de transcripción del H19 (figura 3B, líneas 2-4).

40

[0172] **Células UMUC3:** Al igual que en las células Hep3B, las condiciones de hipoxia aumentaron la expresión del mensaje H19 y el siRNA H19 (número de identificación de secuencia: 1) consiguió reducirla significativamente (figuras 3D-E).

EJEMPLO 4

La disminución de los niveles de H19 RNA ex vivo reduce la tumorigenicidad in vivo tanto en células Hep3B como en células UMUC3

5

MATERIALES Y MÉTODOS

[0173] Ensayo tumorigénico ex vivo: Se transfectó células Hep3B y UMUC3 in vitro con dos dúplex diferentes de siRNA con objetivo de H19 RNA (siRNA con número de identificación de secuencia: 3 para células Hep3B y número de identificación de secuencia: 1 para células UMUC3) y un siRNA de control no relacionado (con objetivo de luciferasa o GFP), respectivamente, tal como se describe anteriormente. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se inoculó las células en ratones atímicos por inyección subcutánea en la región dorsal. Se mantuvo un grupo de control adicional sin tratamiento. Las células fueron tripsinizadas, contadas, centrifugadas y vueltas a poner en suspensión en PBS estéril (1X), de forma que había aproximadamente 5×10^6 células/ml. Se inyectó 250ml de la suspensión en el la región dorsal de ratones atímicos. Entre 15 y 30 días después de la inoculación, dichos ratones comenzaron a presentar tumores. Se midió el volumen de los tumores usando un calibrador.

10

15

[0174] Se llevó a cabo la transfección de los siRNAs con lipofectamina 2000 (Invitrogen, EE.UU.) en placas de 6 pocillos. El día anterior a la transfección, se tripsinizó, contó y plantó las células en una concentración de 100.000/pocillo con 2ml de medio de DMEM sin antibióticos, de forma que confluyeron en un 50% el día de la transfección. Se incubó 5ml de lipofectamina 2000 durante 15 minutos en 250ml de medio OPTI-MEM libre de sérum (Invitrogen, EE.UU.). Esta mezcla se añadió a los 100 μ M de dsRNA diluidos en 250ml de medio OPTI-MEM libre de sérum. Este preparado se mantuvo durante 20 minutos. Se añadió 500ml de la mezcla a las células y se incubaron durante otras 48 horas sin cambiar el medio. Cada grupo con tratamiento constaba de 7 ratones.

20

25

RESULTADOS

[0175] Como muestran las figuras 4A-D, la administración de células Hep3B previamente transfectadas con H19 siRNA en los ratones tuvo como resultado una reducción muy significativa del peso de los tumores (figura 4A) y de su volumen (figura 4B), en comparación con las células transfectadas con luciferasa siRNA. Como muestran las figuras 5A-D, las células UMUC3 transfectadas con H19 siRNA también consiguieron reducir muy significativamente el peso (figura 5A) y el volumen (figura 5B) de los tumores en los ratones, en comparación con las células UMUC3 transfectadas con luciferasa siRNA.

30

EJEMPLO 5

Propiedades oncogénicas del H19 siRNA

[0176] Con el objetivo de dilucidar si el H19 RNA es un producto genético asociado a los tumores o si contiene un posible potencial oncogénico en sí mismo, se llevó a cabo el siguiente experimento.

40

MATERIALES Y MÉTODOS

[0177] Análisis de proliferación celular: Se sembró y transfectó las células Hep3B en placas de 12 pocillos con anti-luc siRNA o H19 siRNA (número de identificación de secuencia: 3). Después de 24 horas, se lavó las células dos veces con PBS, se tripsinizaron y contaron. Se transfectó una concentración de 5×10^3 células de Hep3B en cuádruples en placas de 96 pocillos en un medio con FCS al 10%. Después, se incubaron durante 24 horas antes de llevar a cabo el estudio MTS. El estudio MTS se llevó a cabo siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante (Promega, EE.UU.). Se registró la capacidad de absorción a 940 nm utilizando un lector de placas ELISA.

45

50

RESULTADOS

[0178] Como se muestra en la figura 6, el siRNA H19 no provocó una atenuación estadísticamente relevante en la proliferación celular de Hep3B.

55

[0179] Además, se analizó el efecto de supresión del H19 en el anclaje independiente de la formación de la colonia en agar suave después de la recuperación de la hipoxia como evaluación adicional de la tumorigenicidad in vitro. Se expuso las células Hep3B a estrés hipóxico 4 horas después de la transfección, tal como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Después de 24 en condiciones de hipoxia, se sembró las células en agar suave. El H19 siRNA inhibió significativamente el anclaje de crecimiento independiente después de la recuperación de la hipoxia, durante la cual tanto el número como el tamaño de la colonia se vieron significativamente reducidos (figura 3F).

60

EJEMPLO 6***Inyección intra tumoral in vivo de dúplex H19 siRNA*****5 MATERIALES Y MÉTODOS**

10 **[0180] Preparación de los H19 siRNAs:** El elemento de transfección utilizado fue jetPEI™ (x4) de Polyplus. Se diluyeron 850 pmoles (11 mg de siRNAs) y 10 ml de jetPEI (N/P=10) en 100 ml de solución con glucosa al 5%. Después de 5 minutos, se añadió dicha solución a las soluciones de siRNAs y se mantuvo dicha formulación durante 20 minutos antes de la inyección intratumoral (en células UMUC3) o en el sitio inicial de inoculación (para células Hep3B).

15 **[0181] Procedimiento del experimento:** Se suspendió 1x10⁶ células de carcinoma de vejiga (UMUC3) y de células de carcinoma hepatocelular (Hep3B) en 100 ml de PBS, esta solución se inoculó en 10 ratones atímicos macho (UMUC3) y 8 ratones atímicos macho (Hep3B) por medio de inyección subcutánea dorsal.

20 **[0182] Células UMUC3:** Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de entre 4 y 8 mm aproximadamente, se separó a los ratones en dos grupos homogéneos (n=5), y estos recibieron la primera inyección intratumoral de siRNA de un GFP no relacionado como control, o bien H19 siRNAs (H19 siRNA-3- número de identificación de secuencia: 3). Se administró un total de 3 inyecciones en intervalos de 2 y 5 días después de la primera inyección intratumoral. Después de la última inyección, no se administró ningún tratamiento a los ratones durante 6 días. Se midió los volúmenes de los tumores de los dos grupos tratados por medio de un calibrador, y se registró el peso final de sus tumores, igualmente.

25 **[0183] Células Hep3B:** Para las células Hep3B, el tratamiento continuó 48 horas después de la inoculación antes de poder observar tumores palpables. Se separó a los ratones en dos grupos (cada uno de 4 sujetos), y se inyectó en el sitio de la inoculación inicial. Los ratones fueron inyectados un total de cinco veces, una vez cada dos días, y después de la última inyección, no se les administró tratamiento durante una semana. Transcurrida dicha semana, se sacrificó a los animales.

30 **[0184]** Se calculó el volumen de los tumores mediante la ecuación $V = (L \times W^2) \times 0.5$ (V, volumen; L, longitud; y W, ancho).

RESULTADOS

35 **[0185]** Para determinar las consecuencias funcionales del tumor knockdown H19 en relación a su crecimiento, se inyectó en los ratones atímicos un complejo H19 siRNA-PEI en tumores pequeños inducidos en los casos con línea celular de carcinoma UMUC3 y antes de que se pudiera observar tumores palpables en los casos de línea celular de carcinoma Hep3B. Se utilizó un siRNA sintético de control con objetivo de GFP formulado con PEI para el grupo de control. Como muestran las figuras 7A-B, el H19 siRNA3 genera una reducción muy significativa del volumen medio de los tumores (un 90% aproximadamente) (figura 7A) y del peso medio de los tumores (un 88% aproximadamente) (figura 7B) en células UMUC3.

40 **[0186]** En los tumores inducidos por Hep3B, el nivel de reducción del peso y el volumen de los tumores es menos pronunciado con la utilización de siRNA1. Se observó, así, una reducción aproximada de un 40% en el peso de los tumores (figura 7C), y de alrededor de un 56% en el volumen de los tumores (figura 7D).

EJEMPLO 7**50 *El H19 en células TA11 y TA31***

[0187] Se comprobó que dos líneas celulares de carcinoma humano de vejiga, TA11 y TA31, originarias de la misma línea celular parental, T24P, presentaban bien expresión negativa (TA11H19) o una alta expresión (TA31H19high) de H19 en condiciones de cultivo in vitro normales, respectivamente Ayesh et al, 2002, Mol Carcinog 35, 63-74]. Se llevó a cabo el siguiente experimento para determinar si el mensaje H19 afecta o no el crecimiento del tumor de estas otras líneas celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

60 **[0188]** Se implantó de forma subcutánea células TA11 y TA31 (aproximadamente 2x10⁶) en ratones CD-1 (n=5 de cada tipo). Quince días después de la implantación se midieron los volúmenes de los tumores. Como se muestra en las figuras 8A-B, los tumores derivados de células TA11H19-ve se habían reducido significativamente en tamaño en comparación con los tumores derivados de las células TA31H19high. Además, los tumores derivados de las células TA31H19high estaban significativamente más vascularizados (figuras 8C-D). Los resultados de los análisis RT-PCR de los tumores obtenidos de los tumores derivados de células TA11H19 muestran que el H19 RNA se induce en

dichos tumores, en contraposición con la expresión nula de H19 RNA en dichas células in vitro (no se muestran los datos). Los resultados obtenidos hacen pensar que el H19 RNA aumenta el tamaño del tumor.

EJEMPLO 8

5 ***El H19 RNA en línea celular Hep3B es inducido por estrés hipóxico y el siRNA con objetivo de H19 impide muy eficientemente dicha inducción***

MATERIALES Y MÉTODOS

10 **[0189]** Se sembró las células Hep3B, y después fueron transfectadas con bien anti H19 siRNA, bien anti Luc siRNA, como se describe anteriormente. Después de 24 tras la transfección, unas células se colocaron en una jarra Aneoropack rectangular (Mitsubishi chemical company, Japón) para crear condiciones de hipoxia en espacio de una hora (1% de O2, 20% de Co2), y otras de mantuvieron en concentraciones normales de oxígeno. La incubación duró 15 24 horas, tras lo cual se procedió a la extracción del RNA. Se llevó a cabo un análisis RT-PCR equivalente al descrito en el Ejemplo 1.

RESULTADOS

20 **[0190]** Como se muestra en la figura 9A, se observó una disminución específica del H19 RNA tanto en condiciones de cultivo normales (figura 9A, línea 3) como en condiciones de hipoxia (figura 9A, línea 4), respectivamente. La figura 9B ilustra el análisis PCR de genes constitutivos (GADPH). La figura 9C ilustra el análisis PCR de uPAR.

25 **[0191]** Por favor, nótese que algunas características de la invención que se describen en el contexto de puestas en práctica individuales de la presente invención para una mayor claridad, también pueden proporcionarse en combinación con una forma de puesta en práctica única. Por otra parte, varias características de la invención que se describen en el contexto de una forma de puesta en práctica única con el objetivo de abreviar, también pueden proporcionarse por separado o combinadas de cualquier forma adecuada.

30 **[0192]** A pesar de que la invención se ha descrito en conjunto con otras puestas en práctica detalladas, es evidente que, para aquellas personas expertas en el campo de conocimiento, las diferentes alternativas, modificaciones y variaciones posibles quedan implícitas.

35 **[0193]** Además, debe entenderse que ninguna cita o identificación de ninguna referencia hecha en esta solicitud constituye una admisión de que dicha referencia está disponible como conocimiento del campo anterior a la presente invención.

LISTA DE SECUENCIAS

40 **[0194]**

<110> Yissum Research Development Company of the Hebrew
University of Jerusalem
Hochberg, Avraham
45 Matouk, Imad

<120> AGENTES ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA DISMINUCIÓN DE H19 Y MÉTODOS PARA SU
UTILIZACIÓN

50 <130> 32159

<160> 13

55 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Dúplex siRNA con objetivo H19

65 <400> 1

uaagucuuu gcacugguut t 21

5
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dúplex siRNA con objetivo H19

10
 <400> 2
 gcaggacaug acauggucct t 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Dúplex siRNA con objetivo H19

20
 <400> 3
 ccaacaucaa agacacaut t 21

25
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Dúplex siRNA con objetivo H19

35
 <400> 4
 ccaggcagaa agagcaagat t 21

40
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Dúplex siRNA con objetivo luciferasa

50
 <400> 5
 cuuacgcuga guacuucgat t 21

55
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Dúplex siRNA con objetivo GFP

65
 <400> 6
 gcaagcugac ccugaaguuc au 22

<210> 7
 <211> 3489
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> características misc
 <222> (2599)..(2599)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> características misc

ES 2 435 774 T3

<222> (2815)..(2815)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 7

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ctgcagggcc ccaacaaccc tcaccaaagg ccaaggtggt gaccgacgga cccacagcgg	60
ggtggctggg ggagtcgaaa ctcgccagtc tccactccac tcccaaccgt ggtgccccac	120
gcgggcctgg gagagtctgt gaggccgccc accgcttgtc agtagagtgc gcccgcgagc	180
cgtaagcaca gcccggaac atgcggtcctt cagacaggaa agtggccgcg aatgggaccg	240
gggtgcccag cggctgtggg gactctgtcc tgcggaaacc gcggtgacga gcacaagctc	300
ggtcaactgg atgggaatcg gcctgggggg ctggcaccgc gccaccagg ggtttgcgg	360
cacttcctc tggcctcag cccccaccc ctactctcca ggaacgtgag gtctgagccg	420
tgatggtggc aggaaggggc cctctgtgcc atccgagtcc ccagggacc gcagctggcc	480
cccagccatg tgcaaagtat gtgcagggcg ctggcaggca gggagcagca ggcattggtg	540
cccctgaggg gagacagtgg tctgggaggg agaggtcctg gaccctgagg gaggtgatgg	600
ggcaatgctc agccctgtct ccgatgcca aaggaggggt gcggggaggc cgtctttgga	660
gaattccagg atgggtgctg ggtgagagag acgtgtgctg gaactgtcca gggcggagg	720
gggccctgcg ggggccctcg ggagggccct gctctgattg gccggcaggg caggggcggg	780
aattctggcg ggccacccca gttagaaaa gcccgggcta ggaccgagga gcagggtgag	840
ggagggggtg ggatgggtgg ggggtaacgg gggaaactgg ggaagtgggg aaccgagggg	900
caaccagggg aagatggggt gctggaggag agcttggtgg agccaaggag cacctggac	960
atctggagtc tggcaggagt gatgacgggt ggaggggcta gctcgaggca gggctggtgg	1020
ggcctgaggc cagtgaggag tgtggagtag gtgccaggc atcgtgcaga cagggcgaca	1080
tcagctgggg acgatgggcc tgagctaggg ctggaaagaa gggggagcca ggcattcatc	1140
ccggtcactt ttggttacag gacgtggcag ctggttgac gaggggagct ggtggcagg	1200
gtttgatccc agggcctggg caacggagggt gtagctggca gcagcgggca ggtgaggacc	1260
ccatctgccg ggcaggtgag tccttccct ccccaggcct cgcttccca gccttctgaa	1320
agaaggaggt ttaggggatc gagggctggc ggggagaagc agacaccctc ccagcagagg	1380
ggcaggatgg gggcaggaga gttagcaaag gtgacatctt ctggggggga gccgagactg	1440

ES 2 435 774 T3

cgcaaggctg gggggttatg ggcccgttcc aggcagaaaag agcaagaggg cagggagggg 1500
 gcacaggggtg gycacagcgtta gggccagca cgtgggggtgg taccocaggc ctgggtcaga 1560
 5 cagggacatg gcaggggaca caggacagag gggccccag ctgccacctc acccaccgca 1620
 attcatttag tagcaggcac aggggcagct ccggcacggc tttctcaggc ctatgccgga 1680
 gcctcgaggg ctggagagcg ggaagacagg cagtgtctcg ggagttgcag caggacgtca 1740
 10 ccaggagggc gaagcggcca cgggaggggg gccccgggac attgcgcagc aaggaggctg 1800
 caggggctcg gcctgcgggc gccggcccc cagggcaactg cggcccaggg tctgggtcgg 1860
 agagggccca cagtggactt ggtgacgctg tatgccctca ccgctcagcc cctggggctg 1920
 15 gcttgccaga cagtacagca tccaggggag tcaagggcat ggggcgagac cagactaggc 1980
 gaggcggcg gggcggagtg aatgagctct caggagggag gatggtgcag gcaggggtga 2040
 ggagcgcagc gggcggcgag cgggaggcac tggcctccag agcccgtggc caaggcgggc 2100
 20 ctgcggggcg gcgacggagc cgggatcggg gcctcagcgt tcgggctgga gacgaggggtg 2160
 agttttccc cctctgccac cctcagcccc caccggcccc tccccacaca accaacacgt 2220
 tctcccaca cgaactctctc gttctcccca cagccaggtc tccagctggg gtggacgtgc 2280
 25 ccaccagctg ccgaaggcca agacgccagg tccgggtggc gtgacaagca ggacatgaca 2340
 tggctccgtg tgacggcgag gacagaggag gcgcgtccgg ccttctctgt gagcgtgtct 2400
 gccctccctg cgtcaggagc gccctgcccc gaccgcccc cggcaccatc tcaactgccc 2460
 30 gacctctgtc ttctacagaa caccttaggc tgggtgggct gcgcaagaa ggggtctgt 2520
 ttctttactt cctccacgga gtcggcacac tatggctgcc ctctgggctc ccagaaccca 2580
 caacatgaaa ggtgagggnc ttctgccac acttggggty gggggcacgc gagaggagct 2640
 35 gagtgggacc tcaactcctt ccccatccac agaaatggtg ctaccagct caagcctggg 2700
 cctttgaatc cggacacaaa accctctagc ttggaatga atatgctgca ctttacaacc 2760
 actgcaactac ctgactcagg aatcggtctt ggaaggtgag caccagcgt ccttnggaag 2820
 40 cctccaggcc cccgagcacc ctgccccat cccaccacg tgtcgtatc tctaggtgaa 2880
 gctagaggaa ccagacctca tcagcccaac atcaaaagaca ccatacgaac agcagcgcgc 2940
 45 gcagcaccoca ccccgaccg gogactccat cttcatggcc accccctgcg gtggacgggt 3000
 gaccaccagc caccacatca tcccagagct gagctctcc agcgggatga cgcgctccc 3060
 accacctccc tcttctctt tttcatcctt ctgtctctt gtttctgagc tttctgtct 3120
 50 ttctttttt ctgagagatt caaagcctcc acgactctgt ttccccgtc cttctgaa 3180
 ttaatttgca ctaagtcatt tgcactgggt ggagttgtgg agacggcctt gactctcagt 3240
 acgagtgtgc gtgagtgtga gccaccttg caagtgcctg tgagggccc ggccgcccctc 3300
 55 catctgggccc ggggtgactgg gcgcccgtg tgtgcccag gcctcaccct gccctgcct 3360
 agtctggaag ctccgaccga catcacggag cagccttcaa gcattccatt acgccccatc 3420
 60 tcgctctgtg cccctcccca ccagggett cgcagggacc ctggactcat catcaataaa 3480
 cactgttac 3489

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

5

<400> 8
 aggagcacct tggacatctg 20

10

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

<400> 9
 ccctgtgcc tgctactaaa 20

20

<210> 10
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

<400> 10
 ccggccttcc tgaaca 16

30

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

40

<400> 11
 ttccgatggt gctttgatg t 21

45

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

<400> 12
 tctccagaac atcatcctg c 21

55

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido de DNA monocatenario

60

<400> 13
 ggggtgcgct gttgaagtca gagg 24

REIVINDICACIONES

- 5
- 1) Un siRNA que contiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente en el número de identificación de secuencia: 1, 2, 3 y 4.
- 2) Un compuesto farmacológico formado por un elemento portador farmacológicamente aceptable y, como principio activo, al menos una secuencia siRNA cuya secuencia se selecciona del grupo consistente en el número de identificación de secuencia: 1, 2, 3 y 4.
- 10
- 3) La utilización de un siRNA compuesto de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente en el número de identificación de secuencia: 1, 2, 3 y 4 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 15
- 4) Un siRNA que contiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente en el número de identificación de secuencia: 1, 2, 3 y 4 para el tratamiento del cáncer.
- 20
- 5) Utilización de un agente con capacidad para disminuir el nivel y/o la actividad de H19 mRNA para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con otra terapia para el cáncer en la que el agente es un siRNA que contiene una secuencia de ácido nucleico seleccionado del grupo consistente en el número de identificación de secuencia: 1 a 4.
- 25
- 6) Un agente con capacidad para disminuir el nivel y/o la actividad del H19 mRNA para el tratamiento del cáncer en combinación con otra terapia para el cáncer en la que el agente es un siRNA que contiene una secuencia de ácido nucleico del grupo consistente en el número de identificación de secuencia: 1 a 4.
- 30
- 7) El siRNA de las reivindicaciones 4 o 6, llamado siRNA o agente, debe administrarse in situ.
- 35
- 8) La utilización de siRNA o un agente de cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 5 o 6 cuando el cáncer se selecciona del grupo consistente en tumores sólidos pediátricos, tumores de Wilms, hepatoblastomas, rhabdomyosarcoma embrionario, tumores de las células germinales y tumores trofoblásticos, tumores de las células germinales del testículo, teratoma inmaduro de ovarios, tumores sacrococigeales, coriocarcinomas, tumores trofoblásticos del lecho placentario, tumores epiteliales adultos, carcinoma de vejiga, carcinoma hepatocelular, carcinoma de ovarios, carcinoma cervical, carcinoma pulmonar, carcinoma de mama, carcinoma de las células escamosas en cabeza y cuello, carcinoma de esófago, tumores neurogénicos, astrocitomas, ganglioblastomas y neuroblastomas.
- 40
- 9) La utilización de siRNA o el agente de la reivindicación 8 cuando el cáncer es un carcinoma de vejiga o un carcinoma hepatocelular.
- 45
- 10) Un construido de ácido nucleico que expresa siRNA cuya secuencia se selecciona del grupo consistente en el número de identificación de secuencia: 1 a 4.
- 11) Uso de un construido de ácido nucleico de la reivindicación 10 para la elaboración de un fármaco para el tratamiento del cáncer, en el que dicho construido se expresa en células llamadas siRNA.
- 50
- 12) El construido de ácido nucleico de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento para el cáncer, en el que dicho construido se expresa en células llamadas siRNA.

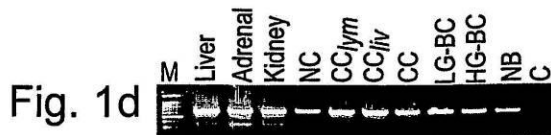
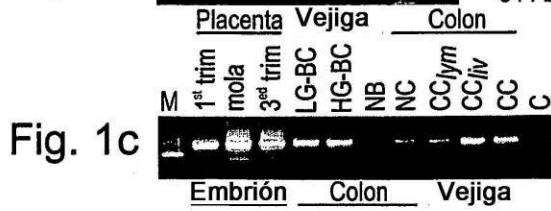
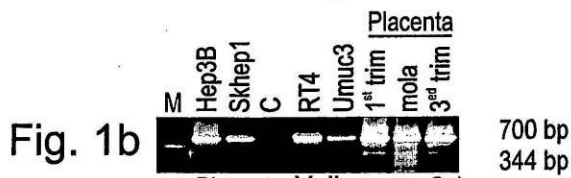
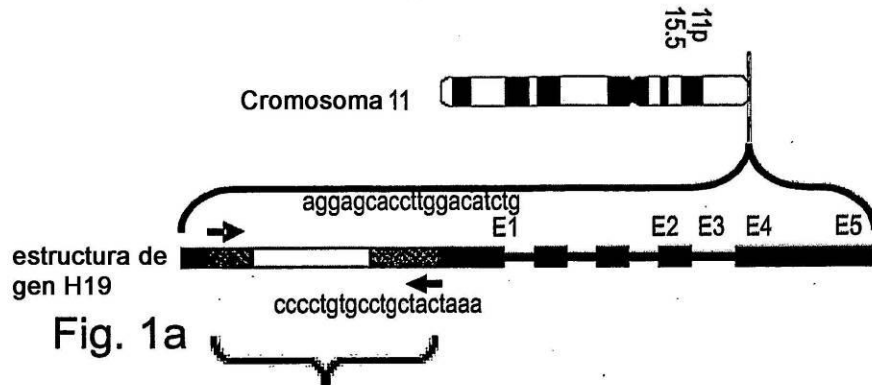
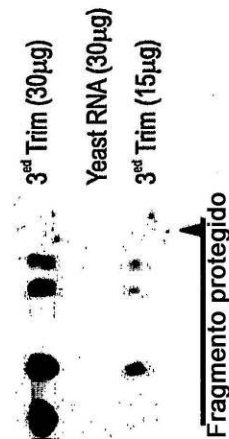


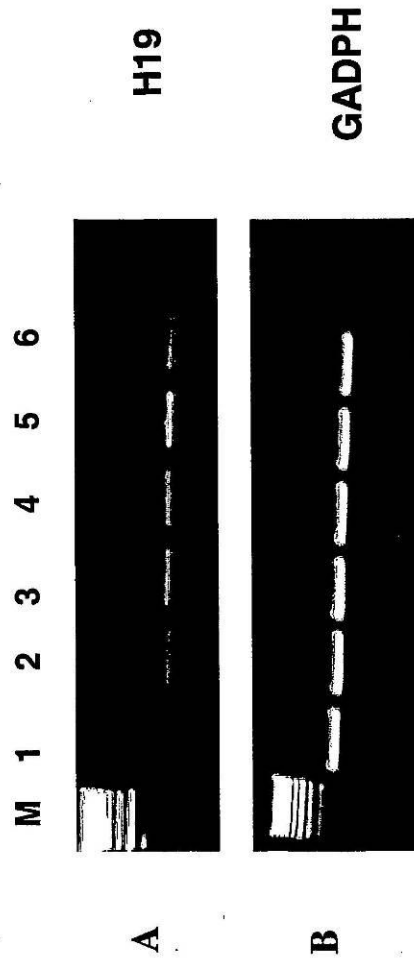
Fig. 1e



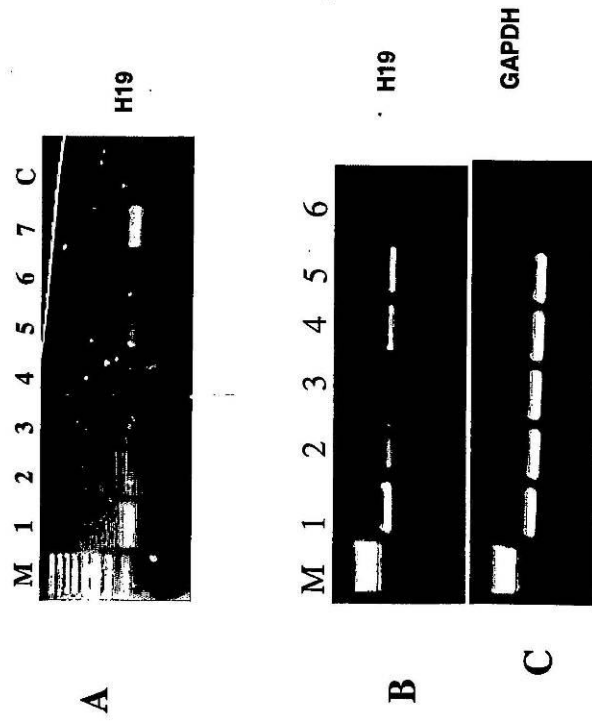
227_CAGGCATCGTGCAGACAGGGNGACATCTTCTCGGGGGAGCCGAGA_608

Fig. 1f

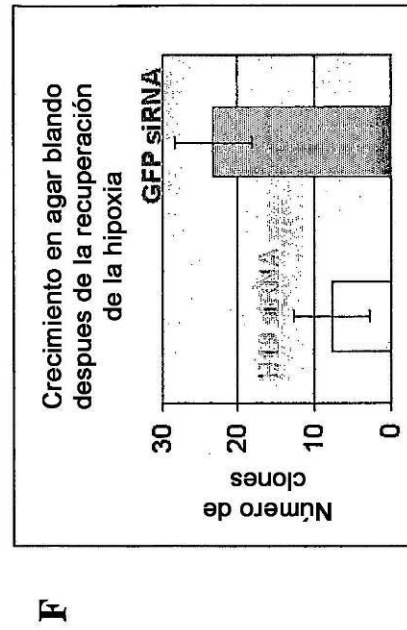
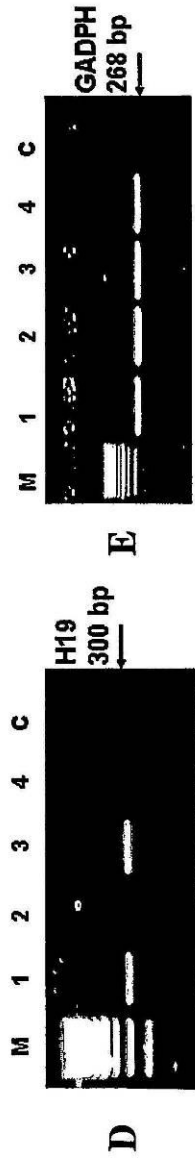
FIGs. 2A-B



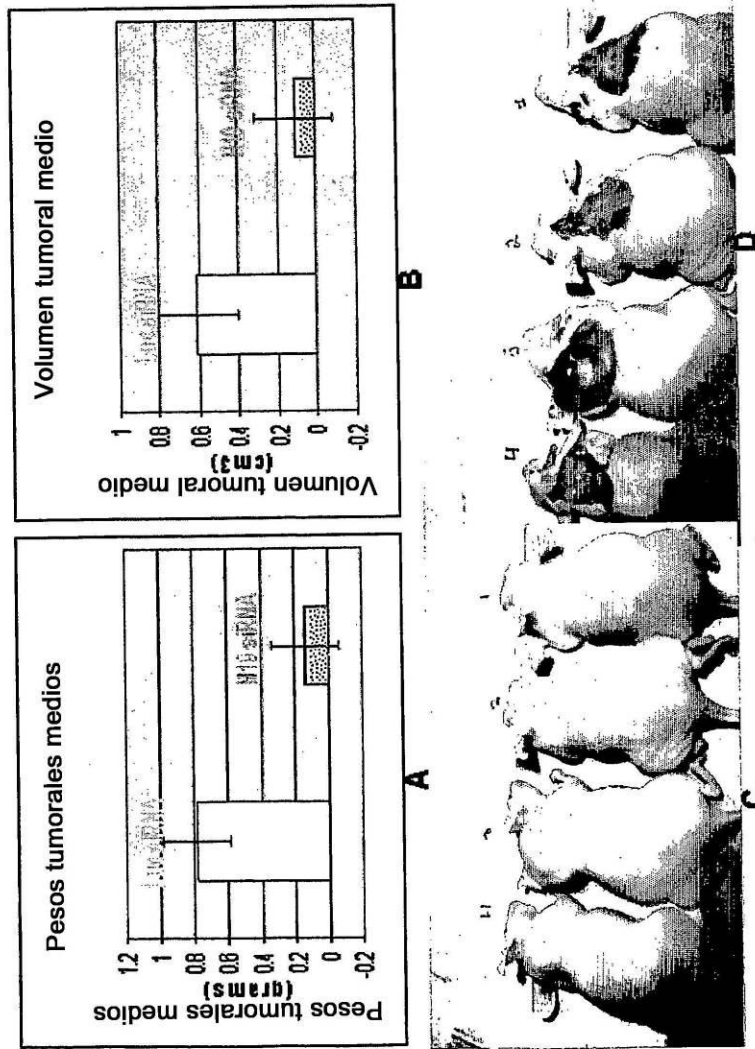
FIGS. 3A-C



FIGs. 3D-F



FIGs. 4A-D



FIGs. 5A-D

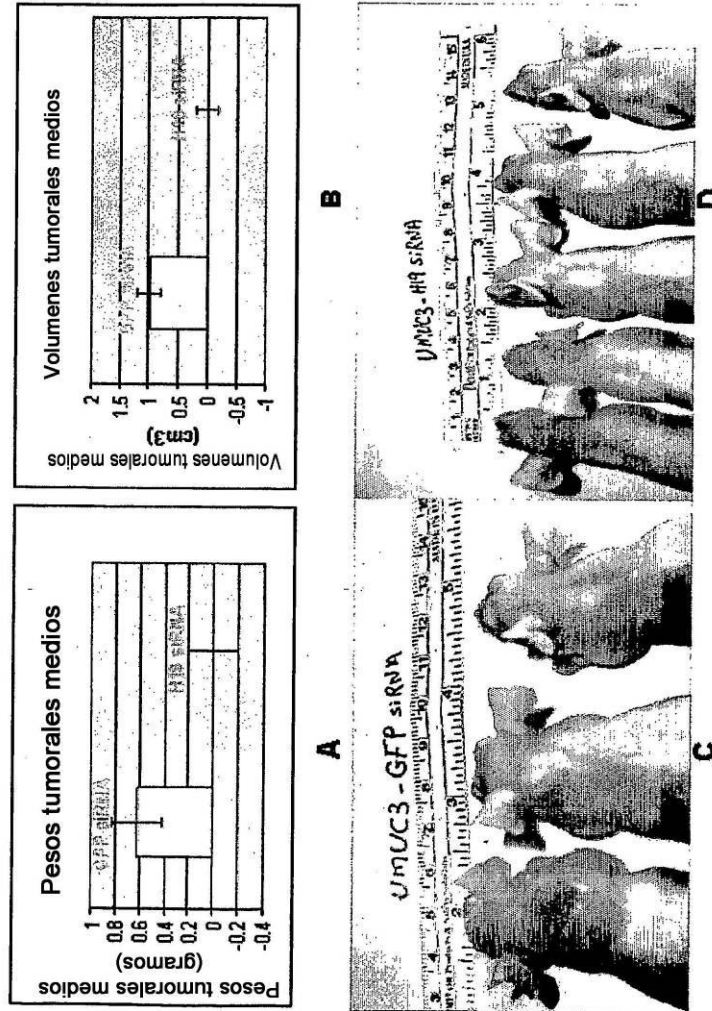
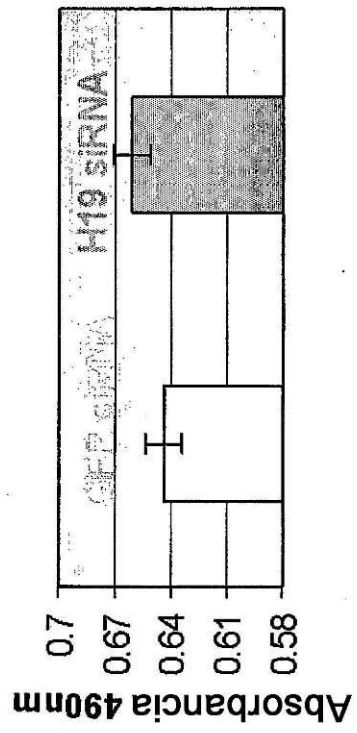


FIG. 6



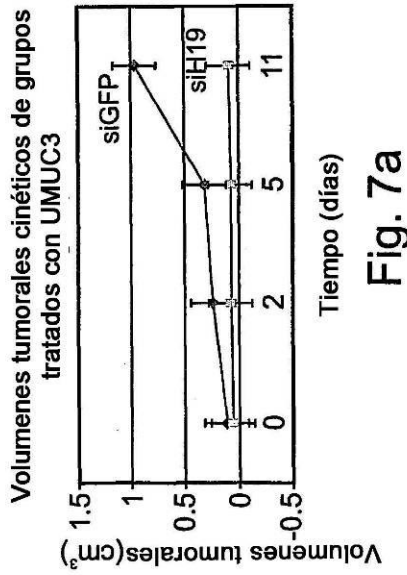


Fig. 7a

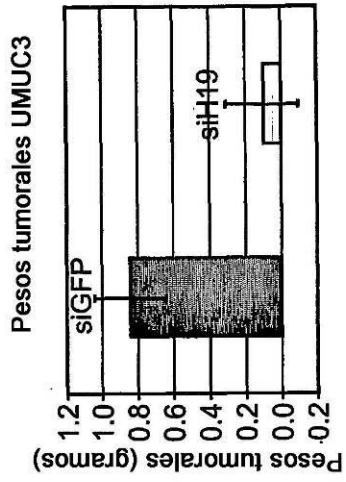


Fig. 7b

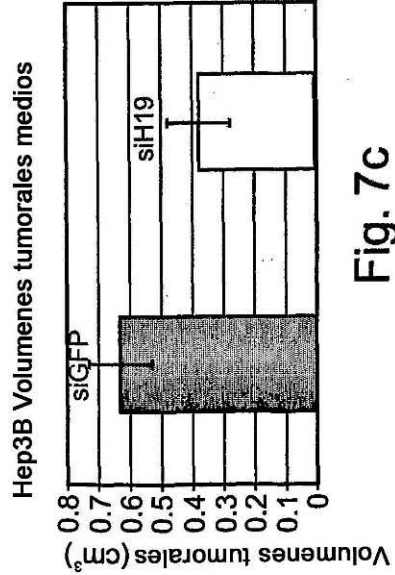


Fig. 7c

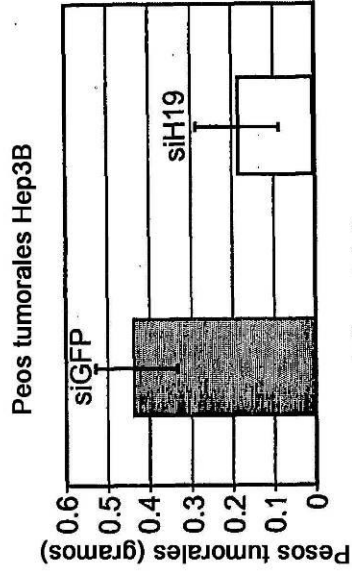


Fig. 7d

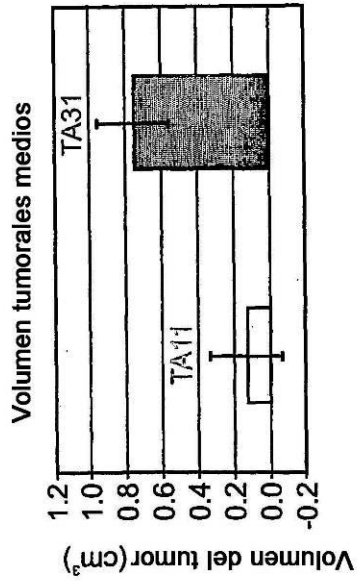
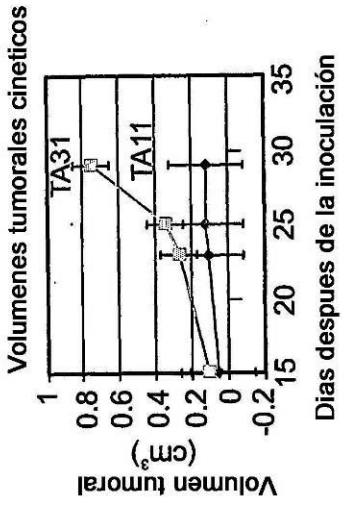


Fig. 8a

Fig. 8b

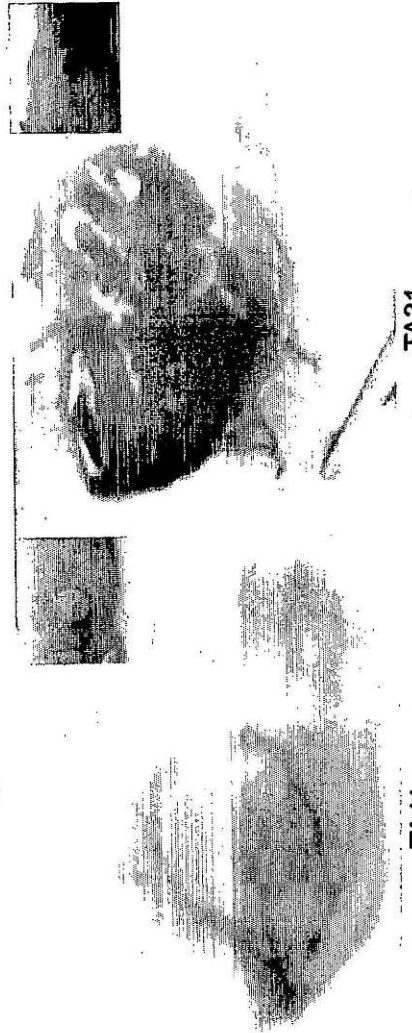


Fig. 8c

Fig. 8d

FIGs. 9A-C

