

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 017**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2005 E 05810600 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1814595**

54 Título: **Tratamiento del cáncer con una combinación de un agente que perturba la ruta de señalización de EGF y un oligonucleótido que reduce los niveles de clusterina**

30 Prioridad:

23.11.2004 US 522948 P

24.11.2004 US 522960 P

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

21.04.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
(100.0%)**

**NO 103 - 6190 AGRONOMY ROAD VANCOUVER
BRITISH COLUMBIA V6T 1Z3, CA**

72 Inventor/es:

**GLEAVE, MARTIN y
ZUPI, GABRIELLA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 456 017 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

Tratamiento del cáncer con una combinación de un agente que perturba la ruta de señalización de EGF y un oligonucleótido que reduce los niveles de clusterina.

5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos 60/522.948 presentada el 23 de Noviembre de 2004 y 60/522.960 presentada el 24 de Noviembre de 2004.

Campo de la invención

10 La presente solicitud se refiere al tratamiento del cáncer en un sujeto mamífero usando una combinación de agentes terapéuticos, uno de los cuales es un oligonucleótido eficaz para reducir la cantidad de clusterina, también conocida como mensaje 2 de próstata reprimido por testosterona (TRPM-2) en las células cancerosas, y el otro de los cuales es un agente que perturba la vía de señalización celular de EGF, y también estimula la expresión de clusterina como consecuencia de su acción sobre la diana. Los ejemplos de los agentes que perturban la ruta de señalización de EGF incluyen agentes que se dirigen a HER-2.

Antecedentes de la invención

15 Después del cáncer de pulmón, el cáncer de mama es la segunda causa principal de muerte por cáncer en mujeres. Según la Organización Mundial de la Salud, más de 1,2 millones de personas serán diagnosticadas de cáncer de mama este año en todo el mundo, y la Sociedad Americana del Cáncer estima que en el año 2004, más de 200.000 mujeres en los Estados Unidos serán diagnosticadas de cáncer de mama invasivo (Fases I- IV), y cerca de 40.000 mujeres y casi 500 hombres morirán de cáncer de mama en los Estados Unidos en 2004.

20 La tasa de incidencia de cáncer de mama (número de casos nuevos de cáncer de mama por cada 100.000 mujeres) se incrementó aproximadamente 4% durante la década de 1980, pero se estabilizó en 100,6 casos por cada 100.000 mujeres en la década de 1990.

25 Los tratamientos convencionales incluyen cirugía, radiación, quimioterapia y terapias hormonales. Cada uno de estos tratamientos tiene inconvenientes que incluyen la pérdida de tejido de la mama, enfermedades asociadas con la radiación o la quimioterapia, efectos secundarios reproductivos y hormonales, y tasas de supervivencia poco fiables.

Por lo tanto el cáncer de mama es una enfermedad grave y mortal en muchos casos, y requiere tratamientos mejorados para reducir las muertes y la prevalencia.

30 La clusterina o "TRPM-2" es una proteína ubicua, con una amplia gama de actividades propuestas. En las células epiteliales de la próstata, la expresión de la clusterina aumenta inmediatamente después de la castración, alcanzando niveles máximos en células de próstata de rata de 3 a 4 días después de la castración, coincidiendo con el inicio de la muerte celular masiva. Estos resultados han llevado a algunos investigadores a la conclusión de que la clusterina es un marcador de muerte celular, y un promotor de la apoptosis. Por otro lado, las células de Sertoli y algunas células epiteliales expresan altos niveles de clusterina sin aumento de los niveles de muerte celular. Sensibar et al., (1995) [1] informaron sobre experimentos *in vitro* realizados para dilucidar con mayor claridad el papel de la clusterina en la muerte de células prostáticas. Los autores utilizaron células LNCaP transfectadas con un gen que codifica clusterina, y observaron si la expresión de esta proteína alteraba los efectos del factor de necrosis tumoral α (TNF α), al que las células LNCaP son muy sensibles. El tratamiento de las células LNCaP transfectadas con TNF α dio como resultado un incremento transitorio en los niveles de clusterina durante unas pocas horas, pero estos niveles cayeron en el momento en el que se observó la fragmentación del ADN que precede a la muerte celular.

La Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos US 20030166591 describe el uso de la terapia antisentido que reduce la expresión de clusterina para el tratamiento del cáncer de próstata y el cáncer de células renales.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 6.383.808 describe composiciones, en particular oligonucleótidos, y métodos para la modulación de la expresión de clusterina.

45 La Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos 2004096882 describe sondas de ARNi terapéuticas que se dirigen a proteínas asociadas con el cáncer incluyendo la clusterina.

La Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos US2004053874 describe la modulación antisentido de la expresión de clusterina.

50 La Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos US 2003166591 describe la terapia antisentido de clusterina usando un oligonucleótido que tiene modificaciones 2'-O-(2-metoxi)etilo.

La Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos US 2003158130 describe el uso de la sensibilización con quimioterapia y la sensibilización con radiación del cáncer por oligodesoxinucleótidos de clusterina antisentido.

Resumen de la invención

Los autores de la presente solicitud han encontrado que los agentes que perturban la ruta de señalización de HER-2 y que son conocidos por ser útiles en el tratamiento del cáncer pueden dar como resultado un aumento de la expresión de la proteína clusterina. Puesto que la clusterina puede proporcionar protección contra la apoptosis, este efecto secundario merma la eficacia del agente terapéutico. Para superar esto, la presente invención proporciona una combinación de agentes terapéuticos que es útil en el tratamiento del cáncer. La combinación de acuerdo con la invención se define en la reivindicación 1.

La combinación de la invención es útil en un método para tratar el cáncer en un sujeto mamífero, que comprende administrar al sujeto el agente terapéutico conocido y un oligonucleótido eficaz para reducir la cantidad de clusterina en las células cancerosas.

El cáncer puede ser, por ejemplo cáncer de mama, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de la glándula salival, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, y vejiga.

Otros aspectos y características de la presente invención se harán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de las realizaciones específicas de la invención junto con las figuras que se adjuntan.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos que ilustran las realizaciones de la invención,

La Figura 1 A muestra un análisis citofluorimétrico de la expresión de la proteína HER-2 en las células BT474 no tratadas (zona de color gris), y tratadas con 10 (línea delgada), 25 $\mu\text{g/ml}$ (línea gruesa) de trastuzumab durante 48 horas, y un control negativo (área punteada);

La Figura 1 B muestra el número de células adherentes (columnas de color negro) y el porcentaje de células apoptóticas (columnas de color blanco) en las células BT474, no tratadas y tratadas con 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab durante 48 h;

La Figura 2 muestra los datos para las células tratadas con 500 nM de ASO de clusterina u oligodesoxinucleótido de control emparejado erróneamente (MM) durante 6 h, seguido por la exposición a 25 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab o medio de control, 48h después del tratamiento;

La Figura 3 es un histograma que muestra los porcentajes relativos de células en las diferentes fases del ciclo celular (medidos utilizando la tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo) después del tratamiento con 500 nM de ASO de clusterina u oligonucleótido de control MM durante 6 h seguido de exposición a 25 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab o medio de control; y

La Figura 4 muestra el análisis citofluorimétrico de tinción de anexina V/PI para las células que fueron tratadas con 500 nM de ASO de clusterina u oligonucleótido de control MM durante 6 horas, seguido de exposición a 25 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab o medio de control. Las células Anexina-V positivas se destacan en el recuadro.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Según se utiliza en la presente memoria, el término "ruta de señalización celular de HER-2" se refiere a la ruta intracelular que es estimulada tras la unión de un ligando a HER-2, un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFr). La familia EGFr comprende EGFR, HER-2, HER-3 y HER-4. La familia EGFr se encuentra en el comienzo de una compleja ruta de transducción/comunicación de señales que modula la proliferación, la supervivencia, la migración y la diferenciación celulares.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "un agente que perturba la ruta de señalización celular de HER-2" se refiere a cualquier agente que es capaz de interrumpir la señal de la célula con HER-2, e incluye un anticuerpo monoclonal específico para HER-2, un inhibidor de molécula pequeña de la unión normal a HER-2, un oligonucleótido antisentido que inhibe específicamente la expresión de HER-2, o un péptido capaz de interferir en la función de señalización de HER-2.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "clusterina" se refiere a la glicoproteína originalmente derivada de testículos rete ovinos, y a proteínas homólogas derivadas de otras especies de mamíferos, incluyendo seres humanos, bien denominadas clusterina bien con un nombre alternativo. Se conocen las secuencias de numerosas especies de clusterina. Por ejemplo, la secuencia de clusterina humana fue referida por Wong et al., (1994) [2], y número de acceso de secuencias NCBI NM_001 831 y se expone en el SEC ID NO. 1. En esta secuencia, la secuencia codificante abarca las bases 48 a 1397.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad de clusterina" se refiere a la cantidad de clusterina que está presente en una forma que es funcional para proporcionar protección anti-apoptótica. La cantidad eficaz de clusterina se puede reducir por medio de la restricción de la producción de clusterina (a nivel de transcripción o de traducción) o de la degradación de clusterina a un ritmo más rápido de lo que se está produciendo. Adicionalmente, se apreciará que la inhibición se produce cuando la clusterina está presente de otro modo si no se ha administrado el oligonucleótido antisentido.

Según se utiliza en la memoria descriptiva, "oligonucleótido antisentido" se refiere a tramos de ADN de cadena sencilla, normalmente modificados químicamente, cuya secuencia (3' → 5') es complementaria a la secuencia efectora de una molécula de ARNm. Las moléculas antisentido inhiben de ese modo eficazmente la expresión génica formando dúplex de ARN/ADN, y ofrecen una opción más singularizada para la terapia contra el cáncer que la quimioterapia o la radiación. Se cree que el oligonucleótido antisentido funciona por medio de una variedad de mecanismos, incluyendo el bloqueo físico de la capacidad de los ribosomas para moverse a lo largo del ARN mensajero, y acelerando la velocidad a la cual el ARNm se degrada en el citosol. La abreviatura ASO también se puede utilizar para hacer referencia a un oligonucleótido antisentido.

Según se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones de esta solicitud, el término "combinación" hace referencia a una reunión de reactivos para su uso en terapia mediante su administración simultánea o contemporánea. La administración simultánea hace referencia a la administración de una mezcla (ya sea una auténtica mezcla, una suspensión, una emulsión u otra combinación física) del agente que perturba la ruta de señalización celular de HER-2 y el oligonucleótido. En este caso, la combinación puede ser la mezcla o recipientes separados del agente y el oligonucleótido que se combinan inmediatamente antes de la administración. La administración contemporánea hace referencia a la administración por separado del agente y el oligonucleótido al mismo tiempo, o en momentos suficientemente próximos de manera que se observe una actividad sinérgica con respecto a la actividad del agente o el oligonucleótido solos. En ésta, la combinación comprende recipientes separados del agente y el oligonucleótido.

Agentes que perturban la ruta de señalización de HER-2

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención hace uso de un agente que perturba la ruta de señalización celular de HER-2. Este agente puede ser cualquier agente que sea capaz de interrumpir la señalización celular de HER-2, e incluye un anticuerpo específico para cualquiera de los miembros de HER-2, un inhibidor de molécula pequeña de la unión normal a HER-2, un oligonucleótido antisentido que inhibe específicamente la expresión de HER-2, o un agente peptídico capaz de interferir en la función de señalización de HER-2.

El agente es uno que perturba la ruta de señalización de EGF mediante la interacción con HER-2. HER-2, también conocido como ERBB2, o receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2, ayuda a controlar cómo crecen, se dividen, y se auto-reparan las células. Se han realizado investigaciones exhaustivas sobre el gen de HER-2 y el papel de la proteína HER-2 en el cáncer que datan de los años ochenta. El gen de HER-2 dirige la producción de proteínas especiales, denominadas receptores HER-2. HER-2 se expresa en exceso en aproximadamente un tercio de todos los cánceres de mama y es la diana del trastuzumab.

Un tipo de agente que se puede utilizar para interactuar con el receptor HER-2 y perturbar la ruta de señalización de EGF es un anticuerpo monoclonal farmacéutico. El anticuerpo puede ser específico para, y unirse al, receptor HER-2. Alternativamente, el anticuerpo se puede unir a un receptor relacionado y afectar de esa manera a la ruta de HER-2. Este anticuerpo puede ser trastuzumab, que se cree que bloquea los receptores HER-2 cuando hay una expresión en exceso, y de ese modo bloquea el crecimiento y el desarrollo del tumor. El trastuzumab, comercializado bajo el nombre comercial de Herceptin™, es un anticuerpo monoclonal recombinante administrado intravenosamente para tratar el cáncer de mama. El trastuzumab se utiliza actualmente combinado con paclitaxel y está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína HER-2.

Otros agentes capaces de perturbar la ruta de señalización celular de HER-2 incluyen agentes antisentido capaces de bloquear la expresión de *HER-2*. La publicación de la Patente de los Estados Unidos 2003105051 describe agentes terapéuticos de ácidos nucleicos para afecciones relacionadas con los niveles de HER-2, y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.910.583 y 6.365.345 describen ácidos nucleicos antisentido para la prevención y el tratamiento de trastornos en los que juega un papel la expresión de c-erbB o erbB2.

Los siguientes ejemplos demuestran que se observa un aumento de la expresión de clusterina cuando se utiliza trastuzumab para dirigirlo a HER-2 en células de cáncer de mama.

Las moléculas pequeñas capaces de actuar como agente para perturbar la señalización celular de HER-2 incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en los documentos de patente publicados US 5.721.237, WO 03035843, y EP 1131304. Los péptidos y peptidomiméticos capaces de actuar como agente que interacciona con el receptor HER-2 y perturbar la ruta de señalización de EGF incluyen aquellos como el adamanolol y los descritos, por ejemplo, en los documentos de patente publicados CA2373721 y US2004006106.

Como alternativa a los agentes que interactúan con HER-2, también se pueden emplear en la invención agentes

que interaccionan con otros miembros de la familia de EGFr. Por ejemplo, Erbitux™ (cetuximab) es un anticuerpo monoclonal farmacéutico conocido que se dirige a las rutas de señalización celular de EGF a través de EGFr en el carcinoma de colon y de cabeza y cuello.

Oligonucleótidos antisentido (ASO)

5 Los oligonucleótidos antisentido son polímeros sintéticos formados por monómeros de desoxinucleótidos como los del ADN. En la presente solicitud, el término oligonucleótidos antisentido incluye oligodesoxinucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido para su uso en la combinación de la invención para el tratamiento del cáncer en seres humanos son complementarios a la secuencia de nucleótidos de la clusterina humana como se expone en el SEQ ID NO: 1. En realizaciones específicas, el oligonucleótido antisentido puede abarcar o bien el sitio de inicio o bien el sitio de terminación de la traducción de la clusterina. El oligonucleótido antisentido comprende y puede consistir esencialmente en un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 2 a 19, o más específicamente el SEQ ID NO: 4, el SEQ ID NO: 5 y el SEQ ID NO: 12. Según se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones de esta solicitud, la expresión "consiste esencialmente en" significa que el oligonucleótido contiene solo las bases de la secuencia identificada o tales bases y un pequeño número de bases adicionales que no alteran materialmente la función antisentido del oligonucleótido. Con el fin de evitar la digestión por la ADNasa, los oligonucleótidos antisentido y los oligonucleótidos a menudo están modificados químicamente. Por ejemplo, los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato se estabilizan para que resistan la digestión con nucleasa sustituyendo uno de los oxígenos del fosforilo del ADN que no forma puente con un azufre. También se puede lograr un aumento de la estabilidad del oligonucleótido antisentido utilizando moléculas con cadenas principales sustituidas con 2-metoxietilo (MOE) como se describe generalmente en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.451.991, y en la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos US-2003-0158143-A1. De este modo, en la combinación de la invención, el oligonucleótido antisentido se puede modificar para mejorar la estabilidad in vivo con respecto a un oligonucleótido no modificado de la misma secuencia. La modificación puede ser una modificación con (2'-O-(2-metoxietilo)). El oligonucleótido puede tener una cadena principal de fosforotioato, los radicales azúcar de los nucleótidos 1-4 y 18-21 pueden tener modificaciones 2'-O-metoxietilo y el resto de los nucleótidos pueden ser 2'-desoxinucleótidos.

El oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido modificado con metoxietilo (MOE) con hueco 5-10-5 correspondiente al SEQ ID NO. 5 de más abajo. El oligonucleótido antisentido puede tener de 10 a 25 bases de longitud, o de 15 a 23 bases de longitud, o de 18 a 22 bases de longitud, o 21 bases de longitud.

Las secuencias ilustrativas que se pueden emplear como oligonucleótidos antisentido en la combinación de la invención se describen en la Publicación de Patente PCT WO 00/49937, la Publicación de Patente de los Estados Unidos US-2002-0128220-A1, y la Patente de los Estados Unidos Núm. 6383808. Las secuencias de los oligonucleótidos antisentido específicos se muestran en la presente solicitud como SEQ ID NO: 2 a 19 y se representan en la Tabla 1.

Tabla 1

SEQ ID NO	Descripción	SECUENCIA (5' a 3')
2	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	GCACAGCAGG AGAATCTTCA T
3	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	TGGAGTCTTT GCACGCCTCG G
4	Oligonucleótido antisentido correspondiente al sitio de inicio de la traducción de TRPM-2 humano	CAGCAGCAG AGTCTTCATCA T
5	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	ATTGTCTGAGACCGTCTGGTC
6	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	CCTTCAGCTTTGTCTCTGATT
7	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	AGCAGGGAGTCGATGCGGTCA
8	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	ATCAAGCTGCGGACGATGCGG
9	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	GCAGGCAGCCCCTGGAGTTGT
10	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	TTCAGCTGCTCCAGCAAGGAG
11	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	AATTTAGGGTTCTTCCTGGAG
12	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	GCTGGGCGGAGTTGGGGGCCT

SEQ ID NO	Descripción	SECUENCIA (5' a 3')
13	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	GGTGTAGACG CCGCAGC
14	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	GCAGCGCAGC CCCTGG
15	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	GCAGCAGCCG CAGCCCGGCT CC
16	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	AGCCGCAGCC CGGCTCCT
17	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	CAGCAGCCGC AGCCCGGCTC
18	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	GCAGCAGCCG CAGCCCGGCT
19	Oligonucleótido Antisentido TRPM-2	AGCAGCCGCAGCCCGGCTCC
20	Oligonucleótido con emparejamiento erróneo de TRPM-2 de 2 bases utilizado como control	CAGCAGCAGAGTATTTATCAT

Un oligonucleótido antisentido particularmente preferido es un oligonucleótido de 21 unidades (CAGCAGCAGAGTCTTCATCAT; SEQ ID NO: 4) dirigido al codón de iniciación de la traducción y los 6 codones siguientes de la secuencia de la clusterina humana con una modificación 2'-MOE. En una realización, este oligonucleótido tiene una cadena principal de fosforotioato. Los radicales azúcar de los nucleótidos 1-4 y 18-21 (las "alas") portan modificaciones 2'-O-metoxietilo y el resto de los nucleótidos (nucleótidos 5-17; el "hueco desoxi") son 2'-desoxinucleótidos. Las citosinas de las alas (esto es, los nucleótidos 1, 4 y 19) son 5-metilcitosinas.

Oligonucleótidos de ARNi

La reducción en la cantidad de clusterina también se puede lograr utilizando ARN de interferencia o "ARNi". ARNi es un término acuñado inicialmente por Fire y colaboradores para describir la observación de que el ARN de doble hebra (ARNdh) puede bloquear la expresión génica[3]. El ARN de doble hebra, o ARNdh dirige el silenciamiento post-transcripcional, específico del gen en muchos organismos, incluyendo los vertebrados. El ARNi implica la degradación del ARNm, pero muchos de los mecanismos bioquímicos subyacentes a esta interferencia son desconocidos. El uso de ARNi se ha descrito adicionalmente[3,4].

El agente inicial para el ARNi es una molécula de ARN de doble hebra que corresponde a un ácido nucleico diana. Se piensa que a continuación el ARNdh es escindido *in vivo* a ARN de interferencia corto (ARNip) que tiene de 21 a 23 nucleótidos de longitud (dúplex de 19-21 pb, cada uno con salientes 3' de 2 nucleótidos). Alternativamente, la interferencia con ARN se puede efectuar a través de la introducción directa en la célula, o la generación en el interior de la célula mediante introducción en la célula de un precursor adecuado (p. ej., vector, etc.) de semejante ARNip o molécula de tipo ARNip. A continuación se puede asociar un ARNip con otros componentes intracelulares para formar un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

Las moléculas de ARN utilizadas en las realizaciones de la presente invención comprenden generalmente una porción de ARN y alguna porción adicional, por ejemplo una porción de desoxirribonucleótidos. El número total de nucleótidos en la molécula de ARN es adecuadamente menor de 49 con el fin de que sean mediadores eficaces de ARNi. En moléculas de ARN preferidas, el número de nucleótidos es de 16 a 29, más preferiblemente de 18 a 23, y lo más preferiblemente 21-23.

En ciertas realizaciones de la invención, el ARNip o la molécula de tipo ARNip tiene menos de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En una realización adicional, el ARNip o las moléculas de tipo ARNip tienen aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud. En una realización, el ARNip o las moléculas de tipo ARNip comprenden una porción dúplex de 19-21 pb, teniendo cada cadena un saliente 3' de 2 nucleótidos.

En ciertas realizaciones de la invención, el ARNip o la molécula de tipo ARNip son sustancialmente idénticos a un ácido nucleico que codifica clusterina o un fragmento o una variante (o un fragmento de una variante) del mismo. Semejante variante es capaz de codificar una proteína que tiene actividad de tipo clusterina. En algunas realizaciones, la hebra efectora del ARNip o de la molécula de tipo ARNip es para la misma región diana que la especie antisentido del SEQ ID NO: 4 o un fragmento del mismo (ARN que tiene residuos de U en lugar de T de la secuencia del ADN). En otras realizaciones, la secuencia de ARNi consiste en el SEQ ID NO: 41 o 43. Por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos 2004096882 describe sondas terapéuticas de ARNi dirigidas a clusterina. Además, se encuentran disponibles en el mercado reactivos y kits para realizar la interferencia con ARNi, por ejemplo, en Ambion Inc. (Austin, TX, USA) y New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA). Las secuencias adecuadas para su uso como ARNi en la presente invención se exponen en la presente solicitud como SEQ ID NO: 21 a 44 como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

SEQ ID NO.	Descripción	SECUENCIA
21	ARNi para clusterina humana	GUAGAAGGGC GAGCUCUGGTT
22	ARNi para clusterina humana	GAUGCUCAACACCUCCUCCT T
23	ARNi para clusterina humana	GGAGGAGGUG UUGAGCAUCT T
24	ARNi para clusterina humana	CUAAUUCAAU AAAACUGUCT T
25	ARNi para clusterina humana	GACAGUUUUA UUGAAUUAGT T
26	ARNi para clusterina humana	UAAUUCAACA AACUGUTT
27	ARNi para clusterina humana	ACAGUUUUGU UGAAUUATT
28	ARNi para clusterina humana	AUGAUGAAGA CUCUGCUGCT T
29	ARNi para clusterina humana	GCAGCAGAGU CUUCAUCAUT T
30	ARNi para clusterina humana	UGAAUGAAGG GACUAACCUG TT
31	ARNi para clusterina humana	CAGGUUAGUC CCUUCAUUCA TT
32	ARNi para clusterina humana	CAGAAUAGA CAAAGUGGGG TT
33	ARNi para clusterina humana	CCCCACUUUG UCUAUUUCUG TT
34	ARNi para clusterina humana	ACAGAGACUA AGGGACCAGA TT
35	ARNi para clusterina humana	ACAGAGACUA AGGGACCAGA TT
36	ARNi para clusterina humana	CCAGAGCUCG CCCUUCUACT T
37	ARNi para clusterina humana	GUAGAAGGGC GAGCUCUGGT T
38	ARNi para clusterina humana	GUCCCGCAUC GUCCGCAGCT T
39	ARNi para clusterina humana	GCUGC GGACG AUGCGGGACT T
40	ARNi para clusterina humana	CUAAUUCAAU AAAACUGUCT T
41	ARNi para clusterina humana	GACAGUUUUA UUGAAUUAGT T
42	ARNi para clusterina humana	AUGAUGAAGA CUCUGCUGC
43	ARNi para clusterina humana	GCAGCAGAGU CUUCAUCAU
44	ARNi para clusterina humana	CCAGAGCUCG CCCUUCUACT T

Cánceres que pueden ser tratados

5 La combinación de la presente invención es útil en el tratamiento de una variedad de cánceres en los que la inhibición de HER-2 es significativa. Estos cánceres incluyen cáncer de mama, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de la glándula salival, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, y cáncer de vejiga.

Se ha sometido a ensayo una variedad de reactivos dirigidos a la familia de EGFr para determinar la eficacia en el tratamiento de cáncer de pulmón. Estos informes se resumen en Tiseo (2004) [9]

10 Se ha demostrado que el redireccionamiento de la expresión de HER-2/neu tiene un potencial terapéutico en el control del desarrollo y el progreso del cáncer de próstata, Di Lorenzo (2004) [10]. También se ha demostrado que Her-2/neu es una diana en el cáncer de ovario, Xu (2003) [11]; el cáncer de glándula salival, Scholl (2001) [12]; del

cáncer de endometrio Cianciulli (2003) [13] y Slomovitz (2004) [14]; el cáncer de páncreas, Baxevanis (2004) [15]; el cáncer de colon y colorrectal, Park (2004) [16], Half (2004) [17] y Nathanson (2003) [18]; y el cáncer de vejiga, Bellmunt (2003) [19].

Métodos

5 La administración de oligonucleótidos antisentido se puede llevar a cabo utilizando los diferentes mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo la administración desnuda y la administración en vehículos lipídicos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los vehículos lipídicos para la liberación de oligonucleótidos antisentido se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.855.911 y 5.417.978. En general, el oligonucleótido antisentido se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral, o inyección directa local en el tumor.

10 La cantidad de oligonucleótido antisentido administrada es aquella eficaz para reducir la expresión de la clusterina en las células cancerosas, particularmente y sorprendentemente cuando está combinada con un agente que perturba la ruta de señalización celular de HER-2. Se apreciará que esta cantidad variará tanto con la eficacia del oligonucleótido antisentido empleado, como con la naturaleza de cualquier vehículo utilizado. La determinación de las cantidades apropiadas para cualquier composición dada está dentro del conocimiento práctico de la técnica, a través de series convencionales de ensayos diseñados para evaluar los niveles terapéuticos apropiados. En una realización, el oligonucleótido antisentido se administra a un paciente humano en una cantidad de entre 40 y 640 mg, o más particularmente, entre 300 y 640 mg. En otra realización, el oligonucleótido antisentido se administra de acuerdo con el peso del sujeto que necesita tratamiento. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser proporcionado a una dosis de 1 a 20 mg/kg de peso corporal.

20 El trastuzumab monoclonal se encuentra disponible en forma de polvo en un vial que contiene 440 mg de fármaco. Se debe mezclar con un líquido antes de la inyección intravenosa, a menudo con una dosis inicial de 4 mg por kilogramo de peso corporal, seguido de una dosis semanal de 2 mg por kilogramo de peso corporal. Véase, por ejemplo, Slamon, DJ et al., 2001 [5].

25 Agentes terapéuticos adicionales

La combinación de acuerdo con la invención se puede utilizar para tratar el cáncer con la administración adicional de agentes quimioterapéuticos u otros agentes útiles en la terapia contra el cáncer de mama y/u oligonucleótidos antisentido adicionales dirigidos a diferentes dianas combinados con agentes terapéuticos eficaces para reducir la cantidad de clusterina activa. Por ejemplo, se puede utilizar oligonucleótido antisentido de clusterina combinado con agentes quimioterapéuticos más convencionales tales como taxanos (paclitaxel o docetaxel), mitoxantrona, doxorubicina, gemcitabina, ciclofosfamida, descarbazina, inhibidores de topoisomerasa), inhibidores de la angiogénesis, agentes de diferenciación e inhibidores de la transducción de señales.

30 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

35 Materiales y Métodos

Células tumorales

La línea celular de carcinoma de mama humano BT474 se cultivó en DMEM con un suplemento de 10% de suero de ternera fetal, glutamina, penicilina y sulfato de estreptomina a 37°C en 5% de CO₂, 95% de aire. Los reactivos para el cultivo celular se adquirieron de Invitrogen (Milán, Italia).

40 Reactivos

Se almacenó el Trastuzumab (Herceptin[®], adquirido de Roche, Monza, Italia) a 4°C y se ajustó a la concentración final con medio de cultivo.

45 Los oligonucleótidos de fosforotioato utilizados en este estudio fueron adquiridos de La Jolla Pharmaceuticals Co. (La Jolla, CA, USA) o proporcionados por OncoGenex Technologies Inc., Vancouver, Canadá. La secuencia del ASO de clusterina utilizada correspondió al sitio de inicio de la traducción de la clusterina humana (5'-CAGCAGCAGAGTCTTCATCAT-3') (SEC ID NO: 4). Se utilizó como control un oligonucleótido con emparejamiento erróneo de clusterina de 2 bases (5'-CAGCAGCAGAGTATTATCAT-3') (SEC ID NO: 20). Los oligonucleótidos fueron liberados en las células en forma de complejos con el reactivo de transfección Lipofectin[™] (Invitrogen). Las células se incubaron con diferentes concentraciones de oligonucleótidos y Lipofectin[™] durante 6 horas en medio OPTIMEM[™] (Gibco). Al final del tratamiento con oligonucleótidos, se reemplazó el medio por medio de crecimiento de nueva aportación que contenía 2% de suero de ternera fetal y en diferentes momentos, las células se procesaron de acuerdo con los diversos análisis que se iban a realizar.

Análisis de proliferación

Se sembraron 5×10^5 células en placas de cultivo de 60 mm (Nunc™, Mascia Brunelli, Milán, Italia) y se dejó que se adhirieran. Cuarenta y ocho horas después de la siembra, las células fueron tratadas con ASO de clusterina a 500 nM durante 6 h. Después del tratamiento con el oligonucleótido, las células fueron expuestas a una concentración 25 μ M de trastuzumab. En diferentes momentos durante el tratamiento, las células se recogieron y se evaluaron utilizando un Cell Viability Analyzer™ (Coulter, Modelo Vi-Cell XR, Beckman, FL, USA).

Transferencia Western

La transferencia Western y la detección se llevaron a cabo como se ha informado anteriormente, por ejemplo, en [7]. En resumen, se cargaron 40 μ g de proteínas totales en SDS-PAGE desnaturalizante. La inmunodetección de la clusterina y las proteínas PARP se llevó a cabo mediante el uso de anti-clusterina de ratón (1:1000, 41 D, Upstate Biotechnology, NY, USA) y anti-PARP de conejo (1:2000, VIC5, Boehringer Mannheim, Alemania), respectivamente. Para verificar la cantidad de proteínas transferidas a una membrana de nitrocelulosa, se utilizó HSP 72/73 como control y se detectó por medio de anti-HSP humana 72/73 (1:1000, Calbiochem Cambridge, MA, USA). Las cantidades relativas de las proteínas transferidas se cuantificaron mediante el barrido de películas autorradiográficas con un escáner densitométrico de gel (Bio-Rad, Milán, Italia) y se normalizaron para las cantidades de HSP 72/73 relacionadas.

Análisis del ciclo celular

La medición del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular se realizó por medio de citometría de flujo (Becton-Dickinson, Heidelberg, Alemania) como han descrito previamente Telford, W.G., L.E. King, y P.J. Fraker (1992) Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*. 13: 137-143[8]. Brevemente, se fijaron 2×10^5 células adherentes y se resuspendieron en una disolución que contenía el colorante yoduro de propidio (PI) a una concentración de 50 μ g/ml. Los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular se calcularon utilizando el programa CELLQuest™ (Becton Dickinson).

Evaluación de la apoptosis

La apoptosis se detectó por medio de análisis citométrico de flujo de los picos sub-G1, y también se analizó por medio de un análisis de Anexina V-FITC versus PI (Vybrant™ Apoptosis Assay, V-13242, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). En resumen, las células adherentes se recogieron, se suspendieron en tampón de unión para anexina (1×10^6 células/ml) y se incubaron con anexina V-FITC y PI durante 15 min, a temperatura ambiente en oscuridad, a continuación se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como gráficos de puntos bi-paramétricos que muestran la fluorescencia verde de anexina V-FITC frente a la fluorescencia roja por PI.

EJEMPLO 1

Aumento de la expresión de clusterina después del tratamiento con trastuzumab en células de cáncer de mama BT474 que expresan en exceso HER-2.

Se expuso la línea celular de cáncer de mama humano BT474, que expresa en exceso el gen HER-2, a concentraciones clínicamente relevantes de trastuzumab. El tratamiento de las células BT474 con trastuzumab reguló a la baja la expresión de la proteína HER-2 de una manera dependiente de la dosis. El análisis mediante citometría de flujo reveló que el canal medio de fluorescencia disminuyó de 173 a 112 y 72 en las células BT474 tratadas con 10 y 25 μ g/ml de trastuzumab, respectivamente. La Figura 1A muestra un análisis citofluorimétrico de la expresión de la proteína HER-2 en células BT474 no tratadas (área gris), y tratadas con 10 (línea fina), 25 μ g/ml (línea gruesa) de trastuzumab durante 48h, y control negativo (área punteada).

La reducción de la expresión de la proteína HER-2 mediada por Trastuzumab estuvo acompañada por la inhibición del crecimiento de las células BT474 sin afectar a la apoptosis (Fig. 1 B). El análisis simultáneo de numerosas células viables y apoptóticas demostró que el tratamiento con trastuzumab disminuyó significativamente el crecimiento celular con un efecto dependiente de la dosis, puesto que el número de células se redujo de aproximadamente 1×10^6 a 8×10^5 y 6×10^5 en las células BT474 tratadas con 10 y 25 μ g/ml de trastuzumab, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento con trastuzumab incluso a la dosis más elevada de 25 μ g/ml indujo poco o ningún incremento en el porcentaje de células apoptóticas (menos de 10%).

A continuación se evaluó si el tratamiento con trastuzumab era capaz de modular la expresión de clusterina/apolipoproteína J. El análisis de transferencia Western de la proteína clusterina en los productos lisados de células BT474 se expuso a trastuzumab (10-25 μ g/ml) hasta durante 48h. La cantidad relativa de la proteína clusterina transferida se cuantificó y se normalizó con respecto a la correspondiente cantidad de proteína HSP 72/73. Se evaluó un experimento representativo de tres experimentos independientes con resultados similares. Ambas concentraciones de trastuzumab regularon al alza la expresión de la proteína clusterina. A 25 μ g/ml de trastuzumab se observó un incremento de 3 veces de la forma de 60 kD y la aparición de la forma de 40 kD.

EJEMPLO 2

Efecto del tratamiento combinado con ASO de clusterina y trastuzumab sobre la tasa de crecimiento de las células BT474.

5 Se evaluó el efecto del tratamiento con oligonucleótidos sobre la expresión de la proteína clusterina. Se transfectoron células BT474 con ASO de clusterina 300 o 500 nM (SEQ ID NO: 4 con modificaciones MOE) (o las mismas concentraciones de su oligonucleótido emparejado erróneamente como control, como se ha descrito más arriba), y se analizó la expresión de la clusterina mediante transferencia Western 48 horas después del tratamiento. El tratamiento de BT474 con ASO de clusterina 100 o 500 nM durante 6 horas redujo la expresión de la proteína clusterina aproximadamente 30 y 50% en comparación con el control de emparejamiento erróneo, respectivamente.

10 El análisis se llevó a cabo 48 horas después de finalizar el tratamiento. La cantidad relativa de la proteína clusterina transferida se cuantificó y se normalizó a la correspondiente cantidad de proteína HSP72/73.

En contraste, los niveles de clusterina no resultaron afectados por el oligonucleótido de control con emparejamiento erróneo de 2 bases (MM) a ninguna de las concentraciones utilizadas.

15 Para determinar si el tratamiento con ASO de clusterina (SEQ ID NO: 4, con modificación MOE) aumenta el efecto citotóxico de trastuzumab, se trataron las células BT474 con ASO de clusterina 500 nM u oligonucleótido de control MM y después se expusieron a 25 µg/ml de trastuzumab durante 48 horas. La Figura 2 muestra el número de células BT474 no tratadas y tratadas con trastuzumab solo o combinado con ASO de clusterina u oligonucleótido de control MM. El trastuzumab redujo el crecimiento de BT474 en aproximadamente 50%, mientras el tratamiento con ASO de clusterina no mostró ningún efecto sobre la proliferación celular. La combinación de trastuzumab con ASO de clusterina, pero no con el oligonucleótido de control MM, aumentó significativamente la quimiosensibilidad de las células, con una reducción de la proliferación celular de hasta 85%.

20 Para estudiar los mecanismos por medio de los cuales el tratamiento con ASO de clusterina aumentaba la quimiosensibilidad de las células al trastuzumab, se analizó la distribución del ciclo celular mediante citometría de flujo. La Figura 3 muestra los histogramas del contenido de ADN en células BT474 tanto tratadas como no tratadas con los agentes solos o combinados. El análisis se llevó a cabo 48 horas después de finalizar los tratamientos.

25 El análisis de los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular reveló que, mientras el tratamiento con ASO de clusterina no mostró ningún efecto sobre la distribución del ciclo celular, la exposición de las células al trastuzumab indujo una disminución del compartimento proliferativo (S-G₂/M) con el incremento concomitante en la fase G₀/G₁ del ciclo celular. Sin embargo, ninguno de los tratamientos indujo la aparición de poblaciones con un contenido de ADN sub-G₁. La distribución del ciclo celular de las células tratadas con trastuzumab más oligonucleótido de control MM fue similar a la del trastuzumab solo. En contraste, se observó una fuerte perturbación del ciclo celular en las células tratadas con trastuzumab y ASO de Clusterina y una fracción significativa de la población celular (aproximadamente 40%) residía en el compartimento sub-G₁.

EJEMPLO 3

35 Efecto del tratamiento combinado con ASO de clusterina y trastuzumab sobre la inducción de la apoptosis.

Se evaluó la apoptosis en células BT474 expuestas a los diferentes tratamientos. La Figura 4 muestra el análisis citofluorimétrico de la tinción con anexina V frente a PI llevada a cabo en BT474 no tratadas y tratadas con trastuzumab solo y combinado con ASO de Clusterina u oligonucleótido de control MM. Utilizando el mismo programa de tratamiento descrito anteriormente, se observó apoptosis (mostrada como región anexina V⁺/PI⁻ de los paneles del gráfico de puntos) solamente después del tratamiento combinado de ASO de Clusterina más trastuzumab. El porcentaje de células anexina V⁺/PI⁻ fue de aproximadamente 40% en la combinación de trastuzumab/clusterina y fue menor de 10% en todos los demás tratamientos.

EJEMPLO 4

Efecto sobre la expresión de la proteína clusterina

45 También se evaluó el efecto de ASO de clusterina y trastuzumab combinados sobre la expresión de la proteína clusterina y la escisión de PARP. Las células se trataron con 500 nM de ASO de clusterina u oligonucleótido de control MM durante 6 horas, a continuación se expusieron a 25 µg/ml de trastuzumab o medio de control. Se analizaron la expresión de la proteína clusterina y la escisión de poli (ADP-ribosa)polimerasa (PARP) mediante transferencia Western. La cantidad relativa de la proteína clusterina transferida se cuantificó y se normalizó con respecto a la cantidad de la proteína HSP 72/73 correspondiente.

50 La expresión de clusterina en la combinación de trastuzumab más oligonucleótido de control MM es la misma que después del tratamiento con trastuzumab solo, pero la combinación de trastuzumab con ASO de clusterina bloqueó la expresión de clusterina inducida por trastuzumab inhibiendo específicamente su expresión.

El análisis de la escisión de PARP demostró que la forma intacta de 116 KD se observaba en todas las muestras examinadas, mientras el fragmento de escisión de PARP de 85 KD se detectó solamente después del tratamiento combinado con trastuzumab más ASO de clusterina.

5 Si bien se han descrito e ilustrado las realizaciones específicas de la invención, tales realizaciones se deben considerar ilustrativas de la invención y no limitantes de la invención.

Referencias

1. Wong et al., Eur.J. Biochem. 221 (3), 917-925 (1994)
2. Sensibar et al., Cancer Research 55: 2431-2437 (1995)
3. Fire et al. (1998) Nature 391, 806-811.
- 10 4. Carthew et al. (2001) Current Opinions in Cell Biology 13, 244-248.
5. Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L. (2001) NEJM Vol. 344(11):783-792
6. Elbashir et al. (2001) Nature 411, 494-498.
- 15 7. Miyake et al. (2000) Testosterone-repressed prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer. Cancer Res. Jan 1; 60(1): 170-6.
8. Telford, W.G., L.E. King, y P.J. Fraker (1 992) Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. Cytometry. 13: 137-143.
9. Tiseo M., Loprevite, M. y Ardizzoni, A. (2004) Epidermal Growth Factor receptor inhibitors a new prospective in the treatment of lung cancer. Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents 4: 1 39-48.
- 20 10. Di Lorenzo et al. (2004) HER-2/neu receptor in prostate cancer development and progression to androgen independence. Tumori 90: 163-70.
11. Xu, X.F. y Xing, P.X. (2003) Discovery and validation of new molecular targets for ovarian cancer. Curr. Opin. Mol. Ther. 5: 625-630.
12. Scholl, S. Beuzeboc, P, y Pouillart, P. (2001) Targeting Her-2 in other tumor types. Ann Oncol. 12 Supl 1: S81-7.
- 25 13. Cianciulli et al. (2003). Her-2/neu oncogene amplification and chromosome 17 aneusomy in endometrial carcinoma: correlation with oncoprotein expression and conventional pathological parameters. J. Exp. Clin. Cancer Res. 22: 265-71.
14. Slomovitz et al., (2004). Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. J. Clin. Oncol. 22: 3126-32.
- 30 15. Baxevanis et al. (2004) Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential in cancer immunotherapy. Cancer Immunol. Immunother. 53: 166-75.
16. Park et al. (2004) Clinical significance of HER-2/neu expression in colon cancer. Korean J. Gastroenterol. 44: 147-52.
- 35 17. Half et al. (2004) HER-2 receptor expression, localization and activation in colorectal cancer cell lines and human tumors. Int. J. cancer 108: 540-8.
18. Nathanson et al. (2003) HER-2/neu expression and gene amplification in colon cancer. Int. J. cancer 105: 796-802.
19. Bellmunt, J, Hussain, M y Dinney, C.P. (2003). Novel approaches with targeted therapies in bladder cancer. Therapy of bladder cancer by blockade of the epidermal growth factor receptor family. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 46
- 40 Supl: S85-104.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Columbia Británica

<120> Tratamiento del cáncer con una combinación de un agente que perturba la ruta de señalización de EGF y un oligonucleótido que reduce los niveles de clusterina

5 <130> P1243EPPC

<140> 05810600.6

<141> 2005-11-22

<150> US 60/522.948

<151> 2004-11-23

10 <150> US 60/522.960

<151> 2004-11-24

<160> 44

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 2859

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctttccgcgg cattctttgg gcgtgagtca tgcaggttg cagccagccc caaagggggg	60
gtgtgcccga gcagagcgt ataaatacgg cgcctcccag tgcccacaac gcggcgtcgc	120
caggaggagc gcgcgggcac aggggtgccg tgaccgaggc gtgcaaagac tccagaattg	180
gaggcatgat gaagactctg ctgctgtttg tggggctgct gctgacctgg gagagtgggc	240
aggctctggg ggaccagacg gtctcagaca atgagctcca ggaaatgtcc aatcagggaa	300
gtaagtacgt caataaggaa attcaaaatg ctgtcaacgg ggtgaaacag ataaagactc	360
tcatagaaaa aacaaacgaa gagcgcaaga cactgctcag caacctagaa gaagccaaga	420
agaagaaaga ggatgcccta aatgagacca gggaatcaga gacaaagctg aaggagctcc	480
caggagtgtg caatgagacc atgatggccc tctgggaaga gtgtaagccc tgccatgaaac	540
agacctgcat gaagtctac gcacgcgtct gcagaagtgg ctcaggcctg gttggccgcc	600
agcttgagga gttcctgaac cagagctcgc ctttctactt ctggatgaat ggtgaccgca	660
tcgactccct gctggagaac gaccggcagc agacgcacat gctggatgtc atgcaggacc	720
acttcagccg cgcgtccagc atcatagacg agctcttcca ggacagggtc ttcacccggg	780
agccccagga tacctaccac tacctgccct tcagcctgcc ccaccggagg cctcacttct	840
tctttcccaa gtcccgcacg gtccgcagct tgatgcccct ctctccgtac gagcccctga	900
acttccacgc catgttccag cccttccttg agatgatata cgaggctcag caggccatgg	960
acatccactt ccatagcccg gccttccagc acccgccaac agaattcata cgagaaggcg	1020
acgatgaccg gactgtgtgc cgggagatcc gccacaactc cacgggctgc ctgcggatga	1080
aggaccagtg tgacaagtgc cgggagatct tgtctgtgga ctgttccacc aacaacccct	1140

```

cccaggctaa gctgcgccg gagctcgacg aatccctcca ggtcgtgag aggttgacca 1200
ggaatacaa cgagctgcta aagtcctacc agtggaagat gctcaacacc tcctccttgc 1260
tggagcagct gaacgagcag tttaaactggg tgtcccggct ggcaaacctc acgcaaggcg 1320
aagaccagta ctatctgcg gtcaccacg tggtctcca cacttctgac tcggacgttc 1380
cttccggtgt cactgaggtg gtcgtgaagc tctttgactc tgatcccatc actgtgacgg 1440
tccctgtaga agtctccagg aagaacccta aatttatgga gaccgtggcg gagaaagcgc 1500
tgcaggaata ccgcaaaaag caccgggagg agtgagatgt ggatgttgc tttgcacctt 1560
cgggggcatc tgagtccagc tcccccaag atgagctgca gccccccaga gagagctctg 1620
cacgtcacca agtaaccagg ccccgacctc caggccccca actccgcccc gcctctcccc 1680
gctctggatc ctgcaactta acactcgact ctgctgctca tgggaagaac agaattgctc 1740
ctgcatgcaa ctaattcaat aaaactgtct tgtgagctga tcgcttggag ggtcctcttt 1800
ttatgtttag ttgctgcttc ccggcatgcc ttcattttgc tatggggggc aggcaggggg 1860
gatggaaaat aagtagaac aaaaagcag tggctaagat ggtatagggg ctgtcatacc 1920
agtgaagaat aaaaggtgga agaataaaag ggatatgatg acaaggttga tccacttcaa 1980
gaattgcttg ctttcaggaa gagagatgtg tttcaacaag ccaactaaaa tatattgctg 2040
caaatggaag cttttctgtt ctattataaa actgtcgatg tattctgacc aaggtgcgac 2100
aatctcctaa aggaatacac tgaaagttaa ggagaagaat cagtaagtgt aaggtgtact 2160
tggattata atgcataatt gatgttttcg ttatgaaaac atttggtgcc cagaagtcca 2220
aattatcagt tttatttcta agagctattg cttttgcagc ggttttattt gtaaaagctg 2280
ttgatctcga gttgtaagag ctcagcatcc caggggcatc ttcttgactg tggcatttcc 2340
tgtccaccgc cggtttata gatcttcata cttttccctg gaccacaggc gtttctcggc 2400
ttttagtctg aaccatagct gggctgcagt accctacgct gccagcagggt ggccatgact 2460
accctgggta ccaatctcag tcttaaagct caggcttttc gttcattaac attctctgat 2520
agaattctgg tcatcagatg tactgcaatg gaacaaaact catctggctg catcccagggt 2580
gtgtagcaaa gtccacatgt aaatttatag cttagaatat tcttaagtca ctgtcccttg 2640
tctctctttg aagttataaa caacaaactt aaagcttagc ttatgtccaa ggtaagtatt 2700
ttagcatggc tgcaaggaa attcagagta aagtcagtgt gattcactta atgatataca 2760
ttaattagaa ttatggggtc agaggtattt gcttaagtga tcataattgt aaagtatatg 2820
tcacattgtc acattaatgt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2859

```

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 gcacagcagg agaattctca t 21

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 3
 tggagcttt gcacgcctcg g 21

<210> 4

ES 2 456 017 T3

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
5	cagcagcaga gtcttcatca t	21
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 5	
	attgtctgag accgtctggt c	21
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
	ccttcagctt tgtctctgat t	21
	<210> 7	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
	agcagggagt cgatgcggtc a	21
	<210> 8	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
	atcaagctgc ggacgatgcg g	21
30	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 9	
35	gcaggcagcc cgtggagttg t	21
	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 10	
	ttcagctgct ccagcaagga g	21
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Homo sapiens	
	<400> 11	
	aatttaggt tcttctgga g	21
	<210> 12	
	<211> 21	
50	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 12	

ES 2 456 017 T3

	gctgggcgga gttggggcc t	21
	<210> 13	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 13	
	ggtgtagacg ccgcacg	17
	<210> 14	
	<211> 16	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 14	
	gcagcgacg ccctgg	16
	<210> 15	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 15	
	gcagcagccg cagcccggct cc	22
20	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 16	
25	agccgcagcc cggctcct	18
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 17	
	cagcagccgc agcccggctc	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 18	
	gcagcagccg cagcccggct	20
	<210> 19	
	<211> 20	
40	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 19	
	agcagccgca gcccggctcc	20
	<210> 20	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 20	
	cagcagcaga gtatttatca t	21
50	<210> 21	
	<211> 21	
	<212> ADN	

<213> Homo sapiens
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(19)
 5 <223> ribonucleótidos
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> desoxinucleótidos
 10 <400> 21
 guagaagggc ggcucuggt t 21
 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleótidos
 20 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> desoxinucleótidos
 25 <400> 22
 gaugcucaac accuccucct t 21
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleótidos
 35 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> desoxinucleótidos
 <400> 23
 ggaggaggug uugagcauct t 21
 40 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 45 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleótidos
 <220>
 50 <221> rasgo_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> desoxinucleótidos
 <400> 24
 cuaauucaau aaaacuguct t 21

ES 2 456 017 T3

	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<220>	
	<221> rasgo_misc	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ribonucleótidos	
10	<220>	
	<221> rasgo_misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> desoxinucleótidos	
	<400> 25	
	gacaguuua uugaauuagt t	21
15	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
20	<221> rasgo_misc	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
25	<221> rasgo_misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> desoxinucleótidos	
	<400> 26	
	uaauucaaca aaacugutt	19
30	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
35	<221> rasgo_misc	
	<222> (1)..(17)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
40	<221> rasgo_misc	
	<222> (18)..(19)	
	<223> desoxinucleótidos	
	<400> 27	
	acaguuuugu ugaauuatt	19
	<210> 28	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> rasgo_misc	
	<222> (1)..(19)	
50	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
	<221> rasgo_misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> desoxinucleótidos	

	<400> 28 augaugaaga cucugcugct t	21
5	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<220> <221> rasgo_misc <222> (1)..(19) <223> ribonucleótidos	
15	<220> <221> rasgo_misc <222> (20)..(21) <223> desoxinucleótidos	
20	<400> 29 gcagcagagu cuucauc t	21
25	<210> 30 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<220> <221> rasgo_misc <222> (1)..(20) <223> ribonucleótidos	
35	<220> <221> rasgo_misc <222> (21)..(22) <223> desoxinucleótidos	
40	<400> 30 ugaaugaagg gacuaaccug tt	22
45	<210> 31 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<220> <221> rasgo_misc <222> (1)..(20) <223> ribonucleótidos	
	<220> <221> rasgo_misc <222> (21)..(22) <223> desoxinucleótidos	
	<400> 31 cagguaguc ccuucauca tt	22
45	<210> 32 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<220> <221> rasgo_misc <222> (1)..(20) <223> ribonucleótidos	
	<220>	

<221> rasgo_misc
 <222> (21)..(22)
 <223> desoxinucleótidos

 5 <400> 32 cagaaauaga caaagugggg tt 22

 <210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 10 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(20)
 <223> ribonucleótidos

 15 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (21)..(22)
 <223> desoxinucleótidos

 <400> 33
 cccacuuug ucuauuucug tt 22

 20 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 25 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(20)
 <223> ribonucleótidos

 <220>
 30 <221> rasgo_misc
 <222> (21)..(22)
 <223> desoxinucleótidos

 <400> 34
 acagagacua agggaccaga tt 22

 <210> 35
 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 40 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(20)
 <223> ribonucleótidos

 <220>
 45 <221> rasgo_misc
 <222> (21)..(22)
 <223> desoxinucleótidos

 <400> 35
 acagagacua agggaccaga tt 22

 <210> 36
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> rasgo_misc

	<222> (1)..(19)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
5	<221> rasgo_misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> desoxinucleótidos	
	<400> 36	
	ccagagcucg cccuucuact t	21
	<210> 37	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
15	<221> rasgo_misc	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
20	<221> rasgo_misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> desoxinucleótidos	
	<400> 37	
	guagaagggc gagcucuggt t	21
	<210> 38	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
30	<221> rasgo_misc	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
35	<221> rasgo_misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> desoxinucleótidos	
	<400> 38	
	gucccgcauc guccgcagct t	21
	<210> 39	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
45	<221> rasgo_misc	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
50	<221> rasgo_misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> desoxinucleótidos	
	<400> 39	
	gcugcggacg augcgggact t	21
	<210> 40	
	<211> 21	
	<212> ADN	

<213> Homo sapiens
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(19)
 5 <223> ribonucleótidos
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> desoxinucleótidos
 10 <400> 40
 cuaauucaau aaaacuguct t 21
 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleótidos
 20 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> desoxinucleótidos
 25 <400> 41
 gacaguuua uugaauuagt t 21
 <210> 42
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(17)
 <223> ribonucleótidos
 35 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (18)..(19)
 <223> ribonucleótidos
 <400> 42
 augaugaaga cucugcugc 19
 40 <210> 43
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 45 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(17)
 <223> ribonucleótidos
 <220>
 50 <221> rasgo_misc
 <222> (18)..(19)
 <223> ribonucleótidos
 <400> 43
 gcagcagagu cuucaucau 19

<210> 44
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <220>
<221> rasgo_misc
<222> (1)..(19)
<223> ribonucleótidos

10 <220>
<221> rasgo_misc
<222> (20)..(21)
<223> desoxinucleótidos

<400> 44
ccagagcucg ccuucuact t

21

REIVINDICACIONES

1. Una combinación para tratar el cáncer en un sujeto mamífero, que comprende
 - (i) un agente que es eficaz para el tratamiento del cáncer en el sujeto mamífero, y perturba la ruta de señalización celular de HER-2 pero incrementa el nivel de expresión de clusterina, siendo el agente un anticuerpo monoclonal específico para HER-2, un inhibidor de molécula pequeña de HER-2, un péptido o peptidomimético capaz de interferir con HER-2, o un oligonucleótido antisentido anti-HER-2, y
 - (ii) un oligonucleótido antisentido o una molécula inductora de la interferencia del ARN, induciendo dicho oligonucleótido o molécula inductora de la interferencia del ARN el redireccionamiento del ARNm de clusterina y comprendiendo nucleótidos en una secuencia que es complementaria al ARNm de clusterina, y siendo adicionalmente eficaz para reducir la cantidad eficaz de clusterina en una célula cancerosa.
2. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente (i) que perturba la ruta de señalización celular de HER-2 es un anticuerpo monoclonal específico para HER-2.
3. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es trastuzumab.
4. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende el oligonucleótido antisentido que es un oligonucleótido de clusterina antisentido.
5. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el oligonucleótido de clusterina antisentido abarca o bien el sitio de inicio o bien el sitio de terminación de la traducción del ARNm de clusterina.
6. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde el oligonucleótido de clusterina antisentido se modifica para aumentar la estabilidad *in vivo* con respecto a un oligonucleótido no modificado de la misma secuencia.
7. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la modificación en el oligonucleótido de clusterina antisentido es una modificación 2'-O-(2-metoxietilo).
8. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la secuencia del oligonucleótido antisentido se expone en uno cualquiera de los SEQ ID NO: 2, 3, 6 a 11, o 13 a 19.
9. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la secuencia del oligonucleótido antisentido se expone en el SEQ ID NO: 5 o el SEQ ID NO: 12.
10. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la secuencia del oligonucleótido antisentido se expone en el SEQ ID NO: 4.
11. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una cadena principal de fosforotioato, los radicales azúcar de los nucleótidos 1-4 y 18-21 portan modificaciones 2'-O-metoxietilo y los nucleótidos restantes (nucleótidos 5-17) son 2'-desoxinucleótidos.
12. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la molécula inductora de interferencia del ARN es un oligonucleótido de ARNi que comprende una secuencia seleccionada entre los SEQ ID NO: 21 a 44.
13. El uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el tratamiento de un cáncer, tal como osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de glándula salival, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de endometrio o cáncer de vejiga.
14. El uso de una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para el tratamiento del cáncer de mama.

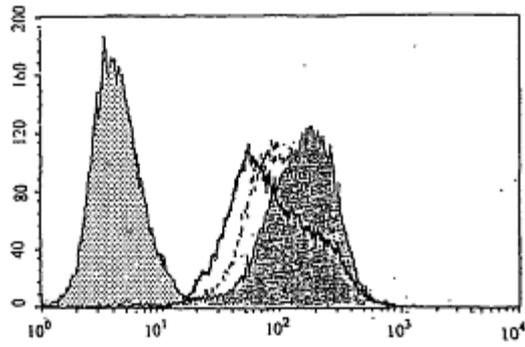


Fig. 1A

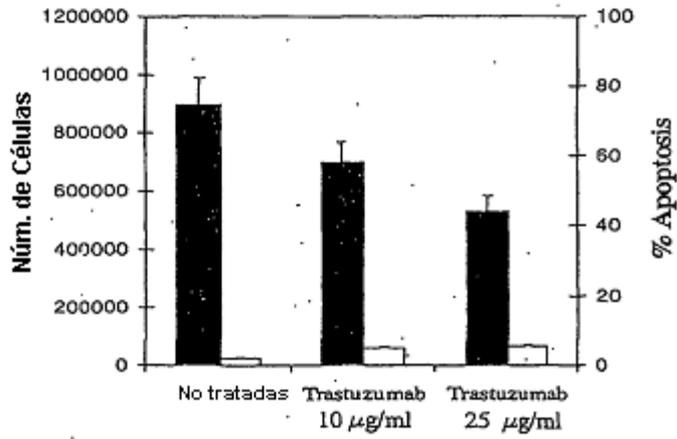


Fig. 1B

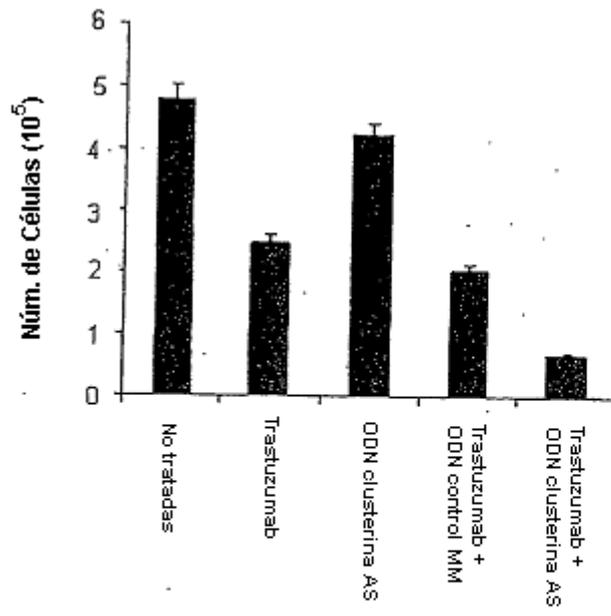


Fig. 2

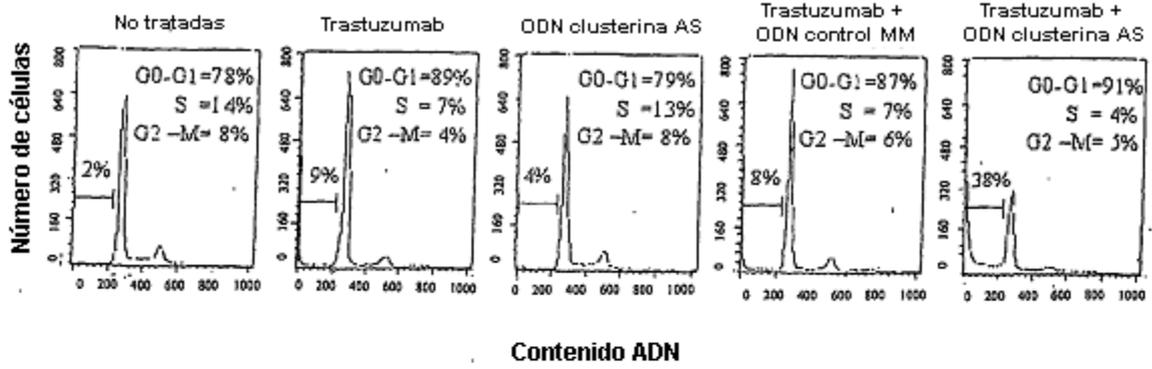


Fig. 3

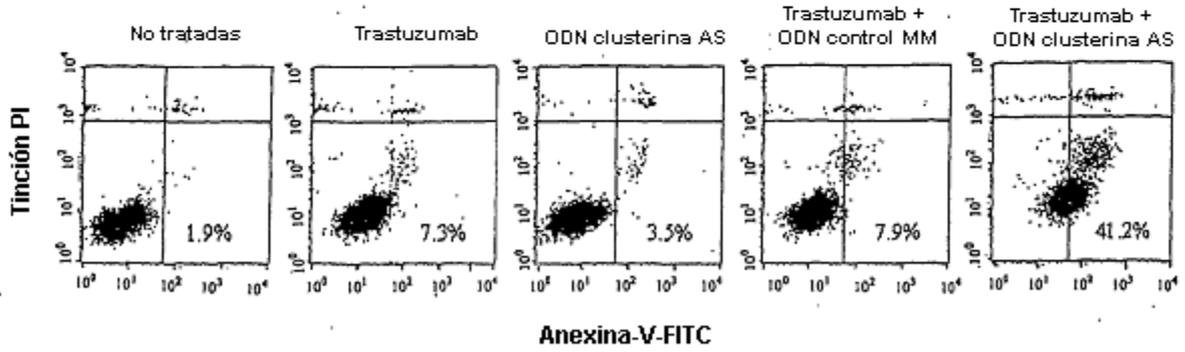


Fig. 4