

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 255**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10735303 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2459230**

54 Título: **Oligonucleótidos que inhiben la migración celular**

30 Prioridad:

31.07.2009 EP 09305723

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

19.12.2014

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (100.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16 , FR**

72 Inventor/es:

**CABON, FLORENCE;
FIRLEJ, VIRGINIE;
GALLOU-KABANI, CATHERINE y
PREVARSKAYA, NATALIA**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 525 255 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

Oligonucleótidos que inhiben la migración celular

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a oligonucleótidos que inhiben la migración celular, la invasión o la metástasis.
- [0002]** En particular, se refiere al uso de oligonucleótidos bicatenarios para la fabricación de fármacos para la prevención o tratamiento de patologías humanas, tales como tumores.
- 10 **[0003]** Más particularmente, la invención tiene por objetivo inhibir la expresión de genes, cuyos productos participan en la activación o mantenimiento de estados patológicos.
- [0004]** La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas para la inhibición de la expresión de genes, cuyos productos participan en la activación o mantenimiento de estados patológicos.
- 15 **[0005]** La trombospondina -1 (TSP1) es una molécula de unión a calcio trimérica grande de 450 kDa compuesta por varios dominios (Carlson et al., 2008) que se une a numerosos ligandos y receptores, incluyendo varias integrinas y el receptor aceptor de CD36. TSP1, que fue la primera molécula antiangiogénica caracterizada (Good et al., 1990), inhibe la migración *in vitro* e induce la apoptosis de células endoteliales (Jimenez et al., 2000). La expresión de TSP1 está inhibida en una gran cantidad de tumores (Ren et al., 2006; Zhang y Lawler, 2007) incluyendo tumores primarios de mama y tumores de próstata dependientes de andrógenos, donde existe una correlación inversa entre la expresión de TSP1 y la densidad de vasos sanguíneos (MVD) (Colombel et al., 2005; Fontana et al., 2005b). Se ha informado previamente de que la expresión de TSP1 es elevada, y ya no está asociada con una MVD reducida, tanto en metástasis de mama (Fontana et al., 2005a), como en tumores invasivos o metastásicos de próstata que se convierten en refractarios a ablación hormonal (Colombel et al., 2005). Sin embargo, no se ha establecido una implicación funcional de TSP1 en el desarrollo de tumores.
- [0006]** Ahora está bien establecido que el calcio, que se une a las repeticiones de tipo III de TSP1 y modifica su plegamiento y propiedades (Adams, 2004; Carlson et al., 2008), regula la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células cancerosas (Abeele et al., 2002; Lehen'Kyi et al., 2007; Thebault et al., 2006). De hecho, los cambios morfológicos y de adherencia cíclicos observados durante la migración celular están acompañados por cambios repetitivos en $[Ca^{2+}]_i$; dependiendo del flujo entrante de Ca^{2+} a través de canales localizados en los canales de la membrana plasmática. La naturaleza molecular de estos canales en las células en migración, e incluso más para células cancerosas metastásicas, aún son en gran medida desconocidos.
- 30 **[0007]** La interferencia de ARN (iARN) es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional donde la introducción de ARN bicatenario en una célula inhibe la expresión génica de un modo dependiente de secuencia. La iARN se ha observado en varios organismos tales como mamíferos, drosophila, nematodos, hongos y plantas, la iARN puede activarse en células de mamífero, notablemente mediante la introducción de ARNip sintético (Carthew y Sontheimer, 2009).
- [0008]** Uno de los objetos de la invención es proporcionar inhibidores de moléculas que facilitan el desarrollo de tumores primarios, o la invasión tumoral, o la metástasis.
- 45 **[0009]** Otro objeto de la presente invención es proporcionar inhibidores de las moléculas que controlan o median la actividad de las moléculas mencionadas anteriormente.
- [0010]** Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden dichos inhibidores.
- 50 **[0011]** Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que sean eficaces para inhibir el progreso tanto de tumores primarios como de tumores invasivos o metastásicos.
- 55 **[0012]** La invención se basa en los inesperados resultados experimentales de acuerdo con los cuales la expresión de TSP1 estimula la migración de las células tumorales desde el entorno hipóxico y por tanto su inhibición produce efectos antitumorales.
- [0013]** Por tanto, en una realización general, la invención se refiere al uso de al menos:
- 60 - un inhibidor de la expresión de proteínas, que inhibe la expresión de:
- proteína TSP1, o
 - una proteína, que controla la expresión de TSP1 o media la actividad de TSP1, o,
- 65 - un inhibidor de la actividad proteica, inhibiendo dicho inhibidor la actividad de:

- la proteína TSP1, en particular la actividad responsable de la estimulación de la migración celular, o
- una proteína que controla la expresión o media la actividad de TSP1, para la fabricación de un fármaco para la prevención o el tratamiento de tumores primarios, o tumores invasivos o metastásicos.

5 **[0014]** Por tanto, la invención se refiere a oligonucleótidos bicatenarios elegidos entre la pareja (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2), la pareja (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22), la pareja (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4), o la pareja (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24), para la fabricación de un fármaco para la prevención o el tratamiento de tumores primarios o tumores invasivos o metastásicos.

10 **[0015]** Los tumores dependen de un suministro adecuado de sangre para su crecimiento. Por lo tanto, para los especialistas en la técnica, la inhibición de la angiogénesis es un método para inhibir el desarrollo de tumores. Se han desarrollado varios compuestos antiangiogénicos en el pasado para alcanzar este objetivo. Por el contrario, la inhibición de un inhibidor de la angiogénesis tal como TSP1 debería aumentar la densidad de los vasos sanguíneos, y por tanto se espera que fomente el desarrollo de tumores. Hasta ahora, no podría abarcarse por los especialistas en la técnica inhibir la expresión o la actividad de la proteína TSP1 para inhibir el desarrollo de tumores.

15 **[0016]** Los inventores han demostrado aquí que aunque la inhibición de TSP1 en tumores no aumenta la densidad de vasos sanguíneos, la inhibición de TSP1 provoca un fuerte efecto antitumoral.

20 **[0017]** Según se expanden los tumores, frecuentemente aparecen regiones hipóxicas en los tumores. La hipoxia estimula la producción de factores angiogénicos tales como factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que es un fuerte activador de la angiogénesis. Los nuevos vasos sanguíneos después irrigan el tumor y proporcionan oxígeno, reduciendo de este modo la hipoxia. Según se reduce la hipoxia, ya no se estimula la producción de VEGF, produciendo un mecanismo de retroalimentación.

25 **[0018]** No existe dicho mecanismo de retroalimentación para controlar la producción de TSP1 en tumores: los inventores han demostrado aquí que la hipoxia induce TSP1 que inhibe la angiogénesis, y por tanto aumenta la hipoxia.

30 **[0019]** Los inventores también han demostrado aquí que TSP1 puede inducirse mediante un segundo mecanismo: moléculas farmacológicas tales como alcanfor o taspigargina que aumentan la concentración de calcio citosólico inducen la secreción y/o producción de TSP1. Dicho aumento en la concentración de calcio puede producirse mediante una desregulación de los canales de calcio. Los inventores demuestran que varios canales de calcio de la familia de potencial receptor transitorio (TRP) regulan la expresión de TSP1. Es de observar que varios de estos canales demostraron estar regulados positivamente en células cancerosas (Prevarskaya et al., 2007).

35 **[0020]** Las inducciones de TSP1 por hipoxia o por una modificación de la concentración intracelular de calcio son dos procesos que pueden suceder independientemente. Sin embargo, puede haber algunos cruces entre estos procesos ya que los inventores muestran que al menos uno de los canales TRP, TRPV3, está regulado positivamente por hipoxia. Además, los inventores muestran que la hipoxia induce un aumento en la concentración intracelular de calcio.

40 **[0021]** De forma importante, los inventores también han demostrado que en tumores de próstata, TSP1 es un estimulador principal de la migración celular *in vitro* y del desarrollo de tumores *in vivo* ya que su silenciamiento inhibía fuertemente el desarrollo tumoral.

45 **[0022]** Un inhibidor de la expresión de proteínas se refiere a una molécula biológica, tal como un oligonucleótido o un péptido, o una proteína, o cualquier otro tipo de moléculas orgánicas o inorgánicas, que inhiban la transcripción del gen que codifica dicha proteína, o la traducción del ARNm del gen que codifica dicha proteína.

50 **[0023]** Una proteína que controla la expresión de TSP1 se refiere a una proteína que controla la transcripción del gen *TSP1* o la traducción del transcrito del gen *TSP1*. Por ejemplo, se han tenido en cuenta varios canales catiónicos no dependientes de voltaje de la familia de potencial receptor transitorio (TRP), tales como TRPV2, TRPV3, TRPV6, TRPM8, en la ilustración de la presente invención.

55 **[0024]** Una proteína que media la actividad de TSP1 se refiere a una proteína, tal como los receptores de la proteína TSP1, que podrían mediar la actividad biológica de la proteína TSP1. Por ejemplo, los receptores de CD36 e integrina B3 se han tenido en cuenta en la ilustración de la presente invención.

60 **[0025]** Un inhibidor de la actividad proteica se refiere a una molécula biológica, tal como un oligonucleótido, o un péptido, o una proteína, o cualquier otro tipo de moléculas orgánicas o inorgánicas que inhiban la actividad biológica de dicha proteína en ensayos *in vivo* o *in vitro*.

65 **[0026]** La estimulación de la migración celular se refiere a una situación donde el porcentaje de células en migración en el grupo tratado es estadísticamente superior que el del grupo de control.

[0027] La capacidad de migración celular puede medirse *in vitro* usando una cámara de Boyden modificada. La cámara de Boyden consiste en dos compartimientos separados por una membrana permeable. Las células se colocan en la cámara superior y los factores quimiotácticos en la cámara inferior. Se cuentan las células que migran a través de la membrana.

[0028] Se da un ensayo de migración detallado en la sección de ejemplo.

[0029] Un tumor primario se refiere a un tumor que crece en el sitio anatómico donde comenzó el progreso del tumor y procedió para producir una masa cancerosa.

[0030] Un tumor invasivo se refiere a un cáncer que se ha roto a través de sus límites iniciales que limitan la membrana, tal como la cápsula de la próstata. Este cáncer se propaga fuera del tejido donde se desarrolla inicialmente y crece en los tejidos sanos adyacentes. "Invasivo" no implica que el cáncer ya se haya propagado fuera de la próstata. "Invasivo" tiene el mismo significado que infiltrante.

[0031] Un tumor metastásico se refiere a un cáncer que se ha propagado desde su sitio original hasta uno o más sitios adicionales del organismo.

[0032] En otra realización, el inhibidor de la expresión de proteínas inhibe la expresión de proteínas elegidas entre el grupo que comprende TSP1, TRPV2, TRPV3, TRPV6, TRPM8, CD36, o integrina B3.

[0033] TRPV2, TRPV3, TRPV6, TRPM8 pertenecen a canales catiónicos no dependientes de voltaje de la familia de potencial receptor transitorio (TRP). Estas proteínas controlan la expresión de la proteína TSP1.

[0034] CD36 y la integrina B3 son receptores de TSP1. Se sabe que TSP1 se une a varios receptores (Roberts, 2008). Estos receptores pueden mediar la actividad de la proteína TSP1.

[0035] En otra realización, el inhibidor de la expresión de proteínas inhibe la expresión *in vivo* e *in vitro* de proteínas elegidas entre el grupo que comprende TSP1, TRPV2, TRPV3, CD36, o integrina B3.

[0036] Los ensayos *in vivo* implican animales vivos, incluyendo seres humanos, ratones y ratas. En la presente invención, la inhibición *in vivo* de la expresión de proteínas puede medirse mediante el crecimiento y el volumen del tejido tumoral que se xenoinjerta en ratones desnudos. La reducción del volumen de un tejido tumoral después de la inyección del inhibidor de la expresión de proteínas, o el inhibidor de la actividad proteica, significa la inhibición *in vivo* de dicha expresión de proteínas.

[0037] Ensayos *in vitro* se refiere, por ejemplo, al uso de células en cultivo, o RT-PCR a tiempo real, etc., para medir la inhibición de la expresión de proteínas.

[0038] En otra realización, el inhibidor de la expresión de proteínas inhibe la expresión *in vivo* de proteínas elegidas entre el grupo que comprende TSP1, TRPV2, TRPV3.

[0039] En otra realización, el inhibidor de la expresión de proteínas es un oligonucleótido bicatenario o un oligonucleótido monocatenario.

[0040] Mediante la expresión "oligonucleótido" se entiende un polinucleótido de 2 a 100, y más particularmente de 5 a 50, y preferiblemente de 13 a 25 nucleótidos, y en particular 19, 20, 21 oligonucleótidos, del tipo de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o la mezcla de los mismos.

[0041] Un oligonucleótido bicatenario puede referirse a un ARNip. Un oligonucleótido monocatenario puede referirse a un microARN o cualquier oligonucleótido monocatenario antisentido usado para inhibir la expresión del gen diana.

[0042] El uso de un oligonucleótido bicatenario es más eficaz que otras estrategias anti-ARN previas tales como ribozima o desoxinucleótidos antisentido monocatenarios porque escinde repetidamente su ARNm diana.

[0043] Además, un oligonucleótido bicatenario es más estable que un oligonucleótido monocatenario.

[0044] Se describe que el inhibidor de la expresión de proteínas es:

- un oligonucleótido bicatenario que comprende dos secuencias oligonucleotídicas, (a) y (b), que forman un híbrido, donde la secuencia oligonucleotídica (a)
 - es complementaria a la secuencia oligonucleotídica (b),
 - o presenta menos del 40% de desapareamientos con dicha secuencia oligonucleotídica (b), y donde la secuencia oligonucleotídica (a)

- es complementaria a una secuencia diana que pertenece a la molécula de ARN o ADN que codifica una de las proteínas definidas anteriormente, cuya expresión tiene que inhibirse,
 - o presenta menos del 40% de desapareamientos con una secuencia diana que pertenece a la molécula de ARN o ADN que codifica una de las proteínas definidas anteriormente, cuya expresión tiene que inhibirse,
- 5
- o un fragmento de los oligonucleótidos bicatenarios definidos anteriormente (a) y (b), que comprende dos fragmentos complementarios de las respectivas secuencias oligonucleotídicas definidas anteriormente (a) y (b), con la condición de que dicho fragmento conserve la propiedad de inhibir la expresión de una de las proteínas definidas anteriormente.
- 10
- [0045]** La secuencia oligonucleotídica (a) es preferiblemente complementaria a la secuencia oligonucleotídica (b), pero puede comprender 1-8 desapareamientos, particularmente 5, más particularmente 3 desapareamientos, incluso más particularmente 1 desapareamiento con la secuencia oligonucleotídica (b).
- 15
- [0046]** La secuencia oligonucleotídica (a) es preferiblemente complementaria a la secuencia diana, pero puede comprender 1-8 desapareamientos, particularmente 5, más particularmente 3 desapareamientos, incluso más particularmente 1 desapareamiento con la secuencia diana; esta aplicación es particular cuando la longitud de la secuencia diana es de 21 nucleótidos.
- 20
- [0047]** Se describe que el inhibidor de la expresión de proteínas es:
- un oligonucleótido bicatenario que comprende dos secuencias oligonucleotídicas, (a) y (b), que forman un híbrido, donde cada secuencia oligonucleotídica comprende en sus extremos 3' o 5', de uno a cinco nucleótidos no apareados que forman extremos monocatenarios que se extienden más allá del híbrido, donde la parte dentro del híbrido de la secuencia oligonucleotídica (a)
- 25
- es complementaria a la secuencia oligonucleotídica (b),
 - o presenta menos del 40% de desapareamientos con dicha secuencia oligonucleotídica (b), y donde la secuencia oligonucleotídica (a)
- 30
- es complementaria a una secuencia diana que pertenece a la molécula de ARN o ADN que codifica una de las proteínas definidas anteriormente, cuya expresión tiene que inhibirse,
 - o presenta menos del 40% de desapareamientos con una secuencia diana que pertenece a la molécula de ARN o ADN que codifica una de las proteínas definidas anteriormente, cuya expresión tiene que inhibirse,
- 35
- o un fragmento de los oligonucleótidos bicatenarios definidos anteriormente (a) y (b), que comprende dos fragmentos complementarios de las respectivas secuencias oligonucleotídicas definidas anteriormente (a) y (b), con la condición de que dicho fragmento conserve la propiedad de inhibir la expresión de una de las proteínas definidas anteriormente.
- 40
- [0048]** La secuencia oligonucleotídica (a) es preferiblemente complementaria a la secuencia oligonucleotídica (b), pero puede comprender 1-8 desapareamientos, particularmente 5, más particularmente 3 desapareamientos, incluso más particularmente 1 desapareamiento con la secuencia oligonucleotídica (b).
- 45
- [0049]** La secuencia oligonucleotídica (a) es preferiblemente complementaria a la secuencia diana, pero puede comprender 1-8 desapareamientos, particularmente 5, más particularmente 3 desapareamientos, incluso más particularmente 1 desapareamiento con la secuencia diana; esta aplicación es particular cuando la longitud de la secuencia diana es de 21 nucleótidos.
- 50
- [0050]** En una realización ventajosa, la secuencia oligonucleotídica complementaria a la secuencia diana comprende de 15 a 25 nucleótidos.
- [0051]** La secuencia oligonucleotídica complementaria a la secuencia diana es una hebra antisentido, y donde la segunda secuencia oligonucleotídica complementaria a la primera secuencia es una hebra con sentido.
- 55
- [0052]** La naturaleza de los nucleótidos comprendidos en la secuencia oligonucleotídica de la presente invención es ribonucleótido, desoxirribonucleótido o ambos de los mismos.
- [0053]** Los nucleótidos comprendidos en la secuencia oligonucleotídica de la presente invención pueden ser nucleótidos naturales (A, T, G, C, U), o nucleótidos modificados químicamente, o una mezcla de los mismos, en particular nucleótidos modificados químicamente que comprenden un grupo reactivo, o un agente enlazador, tal como 5-metilcitosina, xantinosina pseudouridina, dihidouridina, inosina, ribotimidina, 7-metilguanosa o ácidos nucleicos bloqueados (LNA).
- 60
- [0054]** Preferiblemente, la secuencia oligonucleotídica complementaria a la secuencia diana, también diseñada por la hebra antisentido, comprende ribonucleótidos sustancialmente naturales y la hebra con sentido, puede comprender ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o ambos de los mismos.
- 65

[0055] La definición mencionada anteriormente también se aplica a las composiciones farmacéuticas y las secuencias oligonucleotídicas descritas adicionalmente.

5 [0056] En una realización ventajosa, el oligonucleótido bicatenario comprende, en el extremo 3' de cada una de dichas dos secuencias oligonucleotídicas, de 1 a 5 nucleótidos, preferiblemente de 2 a 3 nucleótidos, que se extienden más allá del híbrido.

10 [0057] En una ilustración más ventajosa de la presente invención, los nucleótidos que se extienden más allá del híbrido son desoxitimidinas.

[0058] En una ilustración particular de la presente invención, la expresión de la secuencia diana representada por la SEC ID N° 41 (TSP1) se inhibe por el oligonucleótido bicatenario descrito en la presente invención.

15 [0059] En otra ilustración particular de la presente invención, la expresión de la secuencia diana representada por la SEC ID N° 42 (TRPV3) se inhibe por el oligonucleótido bicatenario reivindicado en las presentes reivindicaciones.

20 [0060] En otra realización particular, el oligonucleótido bicatenario se elige entre una de las siguientes parejas que consisten en (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2); (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4); (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22); (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24).

25 [0061] La Tabla 1 proporciona la lista de secuencias de oligonucleótidos bicatenarios descritas en la presente solicitud. El gen abordado en seres humanos por cada correspondiente secuencia de oligonucleótido bicatenario se da en la primera columna de la tabla. Para TSP1, TRPV3, TRPM8, se muestran 4 diferentes parejas de oligonucleótidos, y dos para CD36, integrina B3, TRPV2, TRPV6.

TABLA 1

Diana del oligonucleótido	Con dTdT	Sin dTdT
TSP1	SEC ID N° 1: CCUUGACAACAACGUGGUGdTdT	SEC ID N° 21: CCUUGACAACAACGUGGUG
TSP1a, especie cruzada	SEC ID N° 2: CACCACGUUGUUGUCAAGGdTdT	SEC ID N° 22: CACCACGUUGUUGUCAAGG
TSP1	SEC ID N° 3: UACCCGAGACGAUUGUAUGdTdT	SEC ID N° 23: UACCCGAGACGAUUGUAUG
TSP1b	SEC ID N° 4: CAUACAAUCGUCUCGGGUAdTdT	SEC ID N° 24: CAUACAAUCGUCUCGGGUA
TRPV3	SEC ID N° 5: CAAGGAGAGCGAACGCAUCdTdT	SEC ID N° 25: CAAGGAGAGCGAACGCAUC
TRPV3a	SEC ID N° 6: GAUGCGUUCGCUCUCCUUGdTdT	SEC ID N° 26: GAUGCGUUCGCUCUCCUUG
TRPV3	SEC ID N° 7: AUGUACAGCGUCAUGAUCCdTdT	SEC ID N° 27: AUGUACAGCGUCAUGAUCC
TRPV3b, especie cruzada	SEC ID N° 8: GGAUCAUGACGCUGUACAUDdTdT	SEC ID N° 28: GGAUCAUGACGCUGUACAU
TRPM8	SEC ID N° 9: UCUCUGAGCGCACUAUUCAdTdT	SEC ID N° 29: UCUCUGAGCGCACUAUUCA
TRPM8a	SEC ID N° 10: UGAAUAGUGCGCUCAGAGAdTdT	SEC ID N° 30: UGAAUAGUGCGCUCAGAGA
TRPM8	SEC ID N° 11: UAUCCGUUCGGUCAUCUAdTdT	SEC ID N° 31: UAUCCGUUCGGUCAUCUA
TRPM8b	SEC ID N° 12: UAGAUGACCGAACGGAAUAdTdT	SEC ID N° 32: UAGAUGACCGAACGGAAUA
CD36	SEC ID N° 13: UACAGACAGUUUUGGAUCUdTdT	SEC ID N° 33: UACAGACAGUUUUGGAUCU
	SEC ID N° 14: AGAUCAAAACUGUCUGUAdTdT	SEC ID N° 34: AGAUCAAAACUGUCUGUA
integrina B3	SEC ID N° 15: GGAGAAUCUGCUGAAGGAUDdTdT	SEC ID N° 35: GGAGAAUCUGCUGAAGGAU
	SEC ID N° 16: AUCCUUCAGCAGAUUCUCCdTdT	SEC ID N° 36: AUCCUUCAGCAGAUUCUCC

Diana del oligonucleótido	Con dTdT	Sin dTdT
TRPV2	SEC ID N° 17: UAAGAGUCAACCUCAACUAdTdT	SEC ID N° 37: UAAGAGUCAACCUCAACUA
	SEC ID N° 18: UAGUUGAGGUUGACUCUUAAdTdT	SEC ID N° 38: UAGUUGAGGUUGACUCUUA
	SEC ID N° 19: GGAAGACAGGCAAGAUCUCdTdT	SEC ID N° 39: GGAAGACAGGCAAGAUCUC
TRPV6	SEC ID N° 20: GAGAUCUUGCCUGUCUUCdTdT	SEC ID N° 40: GAGAUCUUGCCUGUCUUC

5 [0062] Las secuencias oligonucleotídicas descritas en la presente solicitud numeradas de 1 a 20 comprenden en el extremo 3' de cada una de dichas dos secuencias oligonucleotídicas dos desoxitimidinas que se extienden más allá del híbrido. Las secuencias oligonucleotídicas numeradas de 21 a 40 no comprenden ningún nucleótido que se extiende más allá del híbrido; la primera secuencia oligonucleotídica (hebra antisentido) y la segunda secuencia oligonucleotídica (hebra con sentido) tienen la misma longitud, en la Tabla 1.

10 [0063] La expresión de TSP1 en seres humanos puede inhibirse usando uno cualquiera de los siguientes cuatro oligonucleótidos bicatenarios diferentes que abordan el ARNm de TSP1:

- el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, que aborda la parte del ARNm de TSP1 indicada TSP1a en la tabla 1
- o el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22, que aborda la parte del ARNm de TSP1 indicada TSP1a en la tabla 1
- 15 - o el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4, que aborda la parte del ARNm de TSP1 indicada TSP1b en la tabla 1
- o el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24 que aborda la parte del ARNm de TSP1 indicada TSP1b en la tabla 1.

20 [0064] Como la secuencia indicada TSP1a en la tabla 1 está completamente conservada entre varios mamíferos, particularmente entre seres humanos y ratones, el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, o el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22 puede usarse para inhibir la expresión de TSP1 en seres humanos pero también en otros mamíferos.

25 [0065] Se describe que la expresión de TRPV3 en seres humanos puede inhibirse usando uno cualquiera de los siguientes cuatro oligonucleótidos bicatenarios diferentes que abordan el ARNm de TRPV3:

- el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6, que aborda la parte del ARNm de TRPV3 indicada TRPV3a en la tabla 1
- 30 - o el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 25 y SEC ID N° 26, que aborda la parte del ARNm de TRPV3 indicada TRPV3a en la tabla 1
- o el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 7 y SEC ID N° 8, que aborda la parte del ARNm de TRPV3 indicada TRPV3b en la tabla 1
- o el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 27 y SEC ID N° 28 que aborda la parte del ARNm de TRPV3 indicada TRPV3b en la tabla 1

40 [0066] Como la secuencia indicada TRPV3b en la tabla 1 está completamente conservada entre varios mamíferos, particularmente entre seres humanos y ratones, el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 7 y SEC ID N° 8, o el oligonucleótido bicatenario que consiste en la SEC ID N° 27 y SEC ID N° 28 puede usarse para inhibir la expresión de TRPV3 en seres humanos pero también en otros mamíferos.

45 [0067] Un oligonucleótido bicatenario que no reconoce ningún ARN de mamífero conocido hasta hoy en día se usa como control en algunos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Este oligonucleótido bicatenario consiste en la siguiente pareja de secuencias:

Hebra 1: 5'-GAUAGCAAUGACGAAUGCGUAdTdT-3'
Hebra 2: 5'-UACGCAUUCGUCUUAUUCdTdT-3'

50 [0068] Debe apreciarse que pueden sustituirse otros controles, y también se usa inyección *in vivo* del vehículo (PBS) como control.

55 [0069] En una realización ventajosa, el oligonucleótido bicatenario se elige entre las siguientes parejas que consisten en (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2); (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4); (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22); (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24).

[0070] Para desarrollar un oligonucleótido como fármaco terapéutico que inhibe un ARNm dado en seres humanos, es particularmente ventajoso que el oligonucleótido bicatenario aborde una secuencia completamente conservada entre seres humanos y ratones. Esta propiedad permite la evaluación de la eficacia y toxicidad del oligonucleótido en modelos preclínicos antes de su administración a seres humanos. En una realización ventajosa particular, el oligonucleótido bicatenario se elige entre las siguientes parejas que consisten en (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2); (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22).

[0071] En otra realización, la invención se ilustra mediante el uso de un producto que contiene o consiste en:

- al menos un oligonucleótido bicatenario definido anteriormente,
- al menos un agente anti-angiogénico,

para la fabricación de un producto de combinación para un uso simultáneo, separado, o propagado en el tiempo para la prevención o el tratamiento de tumores primarios o tumores invasivos o metastásicos.

[0072] En otra realización, la invención se refiere a un producto que contiene o consiste en:

- al menos un oligonucleótido bicatenario elegido entre la pareja (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2), la pareja (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22), la pareja (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4), o la pareja (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24),
- al menos un agente anti-angiogénico y/o un agente anti-tumoral,

para la fabricación de un producto de combinación para un uso simultáneo, separado, o propagado en el tiempo para la prevención o el tratamiento de tumores primarios o tumores invasivos o metastásicos.

[0073] En otra realización, la invención se ilustra por un producto que contiene o consiste en:

- al menos un oligonucleótido bicatenario definido anteriormente,
- al menos un agente anti-tumoral,

para la fabricación de un producto de combinación para un uso simultáneo, separado o propagado en el tiempo para la prevención o el tratamiento de tumores primarios o tumores invasivos o metastásicos.

[0074] En otra realización, la invención se ilustra por el uso de un producto que contiene o consiste en:

- al menos un oligonucleótido bicatenario definido anteriormente,
- al menos un agente anti-angiogénico,
- al menos un agente anti-tumoral,

para la fabricación de un producto de combinación para un uso simultáneo, separado o propagado en el tiempo para la prevención o el tratamiento de tumores primarios o tumores invasivos o metastásicos.

[0075] En una realización ventajosa, el fármaco se combina con una terapia anti-tumoral, tal como radioterapia o quimioterapia.

[0076] En otra realización, la invención se refiere a:

- un oligonucleótido bicatenario elegido entre la pareja (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2), la pareja (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22), la pareja (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4), o la pareja (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24),
- o un producto que contiene o consiste en:

- al menos un oligonucleótido bicatenario elegido entre la pareja (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2), la pareja (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22), la pareja (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4), o la pareja (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24),
- al menos un agente anti-angiogénico y/o un agente anti-tumoral,

donde el fármaco se combina con una terapia anti-tumoral, tal como radioterapia o quimioterapia.

[0077] En una realización ventajosa, el agente anti-angiogénico se elige entre el grupo que comprende Cilengitida, Vandetanib, Lenalidomida, Talidomida, Trióxido Arsénico, Bevacizumab, anti-VEGFR-1, anti-VEGFR-2, anti-PDGFR, anti-FMS-FLT-3, anti-TK1.

[0078] En una realización ventajosa, el agente anti-tumoral se elige entre el grupo que comprende agentes alquilantes, tales como Bendamustina, Temozolomida, Mecloretamina, Ciclofosfamida, Carmustina, Cisplatino, Busulfán, Tiotepa, o Decarbazina, agentes anti-metabolito, tales como Pentostatina, Metotrexato, Pemetrexed, Floxuridina, Fluorouracilo, Citaraina, Mercaptopurina o Tiguanina, antibióticos citotóxicos tales como Rubitecán, Mitomicina C, Daunorrubicina, Doxorubicina, Bleomicina, Plicamicina, Mitoxantrona HCl, u Oxaliplatino, derivados vegetales, tales como Vinorelbina, BMS 184476, sulfato de Vincristina, Vinblastina, Docetaxel taxol.

[0079] En otra realización ventajosa, el tumor primario o tumor invasivo o metastásico es un tumor sólido o un tumor linfoproliferativo.

[0080] En una realización más ventajosa, el tumor sólido es un tumor de próstata, un tumor de hígado, adenomas hepáticos, hiperplasia nodular focal, un tumor cerebral tal como glioma, un tumor de mama, un tumor de riñón, un tumor de pulmón tal como carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma pulmonar microcítico, blastoma pleuropulmonar y tumor carcinoide, un tumor óseo tal como osteoma, osteocondroma, quiste óseo por aneurisma, y displasia fibrosa, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma, un cáncer de estómago, un tumor de colon, un tumor de intestino delgado, un tumor esofágico, un tumor pancreático, un sarcoma, un tumor cervical, un tumor de vesícula biliar, un melanoma.

[0081] En otra realización más ventajosa, el tumor linfoproliferativo es leucemia, linfoma, o un mieloma múltiple.

[0082] En otra realización, la presente invención se refiere a:

- un oligonucleótido bicatenario elegido entre la pareja (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2), la pareja (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22), la pareja (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4), o la pareja (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24),
- o un producto que contiene o consiste en:

- al menos un oligonucleótido bicatenario elegido entre la pareja (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2), la pareja (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22), la pareja (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4), o la pareja (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24),
- al menos un agente anti-angiogénico y/o un agente anti-tumoral,

donde el fármaco se combina con una terapia anti-tumoral, tal como radioterapia o quimioterapia, donde el tumor primario o el tumor invasivo o metastásico es un tumor sólido o un tumor linfoproliferativo, donde el tumor sólido es tumor de próstata, un tumor de hígado, adenomas hepáticos, hiperplasia nodular focal, un tumor cerebral tal como glioma, un tumor de mama, un tumor de riñón, un tumor de pulmón tal como carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma pulmonar microcítico, blastoma pleuropulmonar y tumor carcinoide, un tumor óseo tal como osteoma, osteocondroma, quiste óseo por aneurisma, y displasia fibrosa, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma, un cáncer de estómago, un tumor de colon, un tumor de intestino delgado, un tumor esofágico, un tumor pancreático, un sarcoma, un tumor cervical, un tumor de vesícula biliar, un melanoma, y donde el tumor linfoproliferativo es leucemia, linfoma, o un mieloma múltiple.

[0083] Se describe que el inhibidor de la actividad proteica puede ser un anticuerpo contra la proteína TSP1 o una proteína que controla la expresión o media la actividad de TSP1, tal como TRPV2, TRPV3, TRPV6, TRPM8, CD36, integrina B3, por ejemplo.

[0084] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica.

[0085] Se describe que la composición farmacéutica comprende como sustancia activa, al menos

- un inhibidor de la expresión de proteínas, que inhibe la expresión de:
 - la proteína TSP1, o
 - una proteína que controla la expresión de TSP1 o media la actividad de TSP1 o,
- un inhibidor de la actividad proteica, inhibiendo dicho inhibidor la actividad de:
 - la proteína TSP1, en particular la actividad responsable de la estimulación de la migración celular, o
 - una proteína que controla la expresión o media la actividad de TSP1, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0086] En una realización ventajosa, el inhibidor de la expresión de proteínas inhibe la expresión de proteínas elegidas entre el grupo que comprenden TSP1, TRPV2, TRPV3, TRPV6, TRPM8, CD36, o integrina B3.

[0087] Se describe que el inhibidor de la expresión de proteínas inhibe la expresión de proteínas elegidas entre el grupo que comprende TSP1, TRPV2, TRPV3, CD36, o integrina B3.

[0088] Se describe que el inhibidor de la expresión de proteínas inhibe la expresión de proteínas elegidas entre los grupos que comprenden TSP1, TRPV2, TRPV3.

[0089] Se describe que el inhibidor de la expresión de proteínas es un oligonucleótido bicatenario o un oligonucleótido monocatenario.

[0090] Se describe que el inhibidor de la expresión de proteínas en la composición farmacéutica es:

- un oligonucleótido bicatenario que comprende dos secuencias oligonucleotídicas, (a) y (b), que forman un híbrido, donde la secuencia oligonucleotídica (a)
 - es complementaria a la secuencia oligonucleotídica (b),
 - o presenta menos del 40% de desapareamientos con dicha secuencia oligonucleotídica (b), y donde la secuencia oligonucleotídica (a)
 - es complementaria a una secuencia diana que pertenece a la molécula de ARN o ADN que codifica una de las proteínas definidas anteriormente, cuya expresión tiene que inhibirse,
 - o presenta menos del 40% de desapareamientos con una secuencia diana que pertenece a la molécula de ARN o ADN que codifica una de las proteínas definidas anteriormente, cuya expresión tiene que inhibirse,
- o un fragmento de los oligonucleótidos bicatenarios definidos anteriormente (a) y (b), que comprenden dos fragmentos complementarios de las respectivas secuencias oligonucleotídicas definidas anteriormente (a) y (b), con la condición de que dicho fragmento conserve la propiedad de inhibir la expresión de una de las proteínas definidas anteriormente.

[0091] La secuencia oligonucleotídica (a) es preferiblemente complementaria a la secuencia oligonucleotídica (b), pero puede comprender 1-8 desapareamientos, particularmente 5, más particularmente 3 desapareamientos, incluso más particularmente 1 desapareamiento con la secuencia oligonucleotídica (b).

[0092] La secuencia oligonucleotídica (a) es preferiblemente complementaria a la secuencia diana, pero puede comprender 1-8 desapareamientos, particularmente 5, más particularmente 3 desapareamientos, incluso más particularmente 1 desapareamiento con la secuencia diana; esta aplicación es particular cuando la longitud de la secuencia diana es de 21 nucleótidos.

[0093] Se describe que el inhibidor de la expresión de proteínas en la composición farmacéutica es:

- un oligonucleótido bicatenario que comprende dos secuencias oligonucleotídicas, (a) y (b), que forman un híbrido, donde cada secuencia oligonucleotídica comprende en uno de sus extremos 3' o 5', de uno a cinco nucleótidos no apareados que forman extremos monocatenarios que se extienden más allá del híbrido, donde la parte dentro del híbrido de la secuencia oligonucleotídica (a)
 - es complementaria a la secuencia oligonucleotídica (b),
 - o presenta menos del 40% de desapareamientos con dicha secuencia oligonucleotídica (b), y donde la secuencia oligonucleotídica (a)
 - es complementaria a una secuencia diana que pertenece a la molécula de ARN, o ADN que codifica una de las proteínas definidas anteriormente, cuya expresión tiene que inhibirse,
 - o presenta menos del 40% de desapareamientos con una secuencia diana que pertenece a la molécula de ARN o ADN que codifica una de las proteínas definidas anteriormente, cuya expresión tiene que inhibirse,
 - o un fragmento de los oligonucleótidos bicatenarios definidos anteriormente (a) y (b), que comprende dos fragmentos complementarios de las respectivas secuencias oligonucleotídicas definidas anteriormente (a) y (b), con la condición de que dicho fragmento conserve la propiedad de inhibir la expresión de una de las proteínas definidas anteriormente.

[0094] La secuencia oligonucleotídica (a) es preferiblemente complementaria a la secuencia oligonucleotídica (b), pero puede comprender 1-8 desapareamientos, particularmente 5, más particularmente 3 desapareamientos, incluso más particularmente 1 desapareamiento con la secuencia oligonucleotídica (b).

[0095] La secuencia oligonucleotídica (a) es preferiblemente complementaria a la secuencia diana, pero puede comprender 1-8 desapareamientos, particularmente 5, más particularmente 3 desapareamientos, incluso más particularmente 1 desapareamiento con la secuencia diana; esta aplicación es particular cuando la longitud de la secuencia diana es de 21 nucleótidos.

[0096] En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, la secuencia oligonucleotídica complementaria a la secuencia diana comprende de 15 a 25 nucleótidos.

[0097] En una realización ventajosa, el oligonucleótido bicatenario comprende, en el extremo 3' de cada una de dichas dos secuencia oligonucleotídicas de 1 a 5 nucleótidos, preferiblemente de 2 a 3 nucleótidos, que se extienden más allá del híbrido.

[0098] Los nucleótidos que se extienden más allá del híbrido pueden ser complementarios o no a la secuencia diana.

[0099] Los nucleótidos que se extienden más allá del híbrido pueden ser cualquier nucleótido natural.

65

[0100] En una realización más ventajosa, los nucleótidos que se extienden más allá del híbrido son desoxitimidinas.

5 **[0101]** En una ilustración particular de la presente invención, la expresión de la secuencia diana representada por la SEC ID N° 41 (TSP1) se inhibe por el oligonucleótido bicatenario reivindicado en la presente solicitud.

10 **[0102]** En otra realización particular, la composición farmacéutica de la presente invención comprende como sustancia activa, el oligonucleótido bicatenario elegido entre las siguientes parejas que consisten en (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2); (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4); (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22); (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24).

15 **[0103]** En otra realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende como sustancia activa, al menos un oligonucleótido bicatenario elegido entre las siguientes parejas que consisten en (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2); (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4); (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22); (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24) en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0104] En una realización ventajosa, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución salina.

20 **[0105]** En otra realización ventajosa, el oligonucleótido bicatenario usado en la composición farmacéutica de la presente invención se acopla con colesterol o sustancias que posibilitan la penetración de dicho oligonucleótido bicatenario en las células.

25 **[0106]** En otra realización más ventajosa, las sustancias que posibilitan la penetración de dicho oligonucleótido bicatenario en las células son por ejemplo liposomas, agentes basados en lípidos, nanopartículas, esferas magnéticas, derivados de polietileneimina.

[0107] En una realización ventajosa, la sustancia activa se formula para la administración a una dosis en el intervalo de 0,05 a 50 mg/kg, en particular 0,1 a 20 mg/kg.

30 **[0108]** La sustancia activa que comprende el oligonucleótido bicatenario puede administrarse a una dosis modificada pero suficiente de acuerdo con la vía de aplicación o la forma de la sustancia activa.

35 **[0109]** En una realización ventajosa, la sustancia activa se formula para una de las siguientes administraciones: intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, instilación nasal, sublingual, intra-rectal, inyección directa en el tumor, tópica u oral.

[0110] Los oligonucleótidos de la presente invención puede introducirse por transfección en células que después se inyectan en los tejidos, o inyectarse directamente en los tejidos, por ejemplo por vía local, sistémica, aerosol.

40 **[0111]** En una ilustración ventajosa de la presente invención, la composición farmacéutica comprende, como sustancia activa, un producto que contiene o consiste en:

- al menos un oligonucleótido bicatenario definido anteriormente y reivindicado en la presente solicitud,
- al menos un agente anti-angiogénico,

45 como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o propagado en el tiempo.

[0112] En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende, como sustancia activa, un producto que contiene o consiste en:

- 50 - al menos un oligonucleótido bicatenario definido anteriormente y reivindicado en la presente solicitud,
- al menos un agente anti-tumoral,

como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o propagado en el tiempo.

55 **[0113]** En una ilustración preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende, como sustancia activa, un producto que contiene o consiste en:

- 60 - al menos un oligonucleótido bicatenario definido anteriormente y reivindicado en la presente solicitud,
- al menos un agente anti-angiogénico,
- al menos un agente anti-tumoral,

como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o propagado en el tiempo.

65 **[0114]** En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como sustancia activa, un producto que contiene o consiste en:

- al menos un oligonucleótido bicatenario elegido entre la pareja (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2), la pareja (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22), la pareja (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4), o la pareja (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24),
- al menos un agente anti-angiogénico, y/o un agente anti-tumoral,

como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o propagado en el tiempo.

[0115] El agente anti-angiogénico de la composición farmacéutica de la invención puede elegirse entre el grupo que comprende Cilengitida, Vandetanib, Lenalidomida, Talidomida, Trióxido Arsénico, Bevacizumab, anti-VEGFR-1, anti-VEGFR-2, anti-PDGFR, anti-FMS-FLT-3, anti-TK1.

[0116] El agente anti-tumoral de la composición farmacéutica de la invención puede elegirse entre el grupo que comprende agentes alquilantes, tales como Bendamustina, Temozolomida, Mecloretamina, Ciclofosfamida, Carmustina, Cisplatino, Busulfán, Tiotepa, o Decarbazina, agentes anti-metabolito, tales como Pentostatina, Metotrexato, Pemetrexed, Floxuridina, Fluorouracilo, Citaraina, Mercaptopurina o Tiguanina, antibióticos citotóxicos tales como Rubitecán, Mitomicina C, Daunorrubicina, Doxorubicina, Bleomicina, Plicamicina, Mitoxantrona HCl, o Oxaliplatino, derivados vegetales, tales como Vinorelbina, BMS 184476, sulfato de Vincristina, Vinblastina, Docetaxel taxol.

[0117] En otra realización, la invención se refiere a la secuencia oligonucleotídica elegida entre las siguientes secuencias: SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24.

[0118] En otra realización, la invención se refiere a oligonucleótidos bicatenarios elegidos entre las siguientes parejas que consisten en (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2); (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4); (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22); (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24).

Descripción de las figuras

[0119]

La Figura 1A representa el nivel de ARNm de TSP1 en células de tumor de próstata dependiente de andrógenos (LNCaP), resistente a castración (C4-2 y 22RV1), o independiente de andrógenos (PC3). Los resultados (media \pm ETM, $n > 3$) están normalizados al nivel de ARNm de ciclofilina A y expresados en unidades arbitrarias (LNCaP establecido a 1).

La Figura 1B representa el nivel correspondiente de proteína TSP1 en células de tumor de próstata dependiente de andrógenos (LNCaP), resistente a castración (C4-2 y 22RV1), o independiente de andrógenos (PC3). Se usó tubulina como control de carga.

La Figura 1C representa el nivel de ARNm de TSP1 en células C4-2 48 h después de transfección con dos diferentes ARNip que abordan el ARNm de TSP1. Los resultados, normalizados al nivel de ARNm de ciclofilina A en las mismas células, se expresan como unidad arbitraria, media \pm ETM de 3 experimentos independientes.

La Figura 1D representa la expresión de TSP1, visualizada por inmunofluorescencia indirecta en células C4-2 48 h después de transfección con TSP1a- o TSP1b-ARNip.

La Figura 1E representa la actividad metabólica de células C4-2 después de transfección de TSP1a- o TSP1b-ARNip.

La Figura 1F representa la actividad enzimática de las caspasas 3 y 7 medida 48 h después de transfección de células C4-2 con el TSP1a- o TSP1b-ARNip. Los resultados no son estadísticamente diferentes entre el control o células transfectadas con TSP1-ARNip.

La Figura 1G representa la capacidad de migración hacia medio fresco de cultivo de células C4-2 (barras negras) o PC3 (barras grises) transfectadas con los ARNip indicados. Dos días después de la transfección, las células se sembraron en la parte superior de la cámara de Boyden y se contó la cantidad de células que habían migrado hacia medio fresco 18 h después. Los resultados se expresan como el porcentaje de células en migración en comparación con células que migran en condiciones de control (media \pm ETM, $n = 3$). El experimento se repitió 3 veces con resultados comparables.

La Figura 1H representa la capacidad de migración de LNCaP hacia medio condicionado desde células LNCaP o C4-2. Las células LNCaP (barras negras) o C4-2 (barras grises) se sembraron en la parte inferior de cámaras de Boyden. Unos 2 días después, las células LNCaP se sembraron en la cámara superior y se contó la cantidad de células en migración 18 h después. Los resultados se expresan como en G.

La Figura 1I representa la expresión de TSP1, medida por transferencia de western, en homogeneizados celulares y en el medio condicionado de células JT8 cultivadas durante 2 días en presencia (dox+) o ausencia (dox-) de doxiciclina. Las células JT8 son células de fibrosarcoma transfectadas de forma estable con un plásmido tet-reprimible que codifica TSP1.

La Figura 1J representa la migración de células C4-2 hacia el medio condicionado por células JT8 TSP1-inducibles cultivadas en presencia de doxiciclina para reprimir la expresión de TSP1 o en ausencia de doxiciclina para inducir TSP1. Los resultados se expresan como en G.

La Figura 1K representa la capacidad de migración de células C4-2 transfectadas con los ARNip indicados. Dos días después de la transfección, las células se sembraron en la parte superior de la cámara de Boyden y se contó la cantidad de células que habían migrado hacia el medio fresco 2 días después. Los resultados se

expresan como en la Figura 1C.

La Figura 1L representa la capacidad de migración de C4-2 hacia medio condicionado de C4-2 en ausencia o presencia de un anticuerpo que inhibe la unión de TSP1 a CD36. Las células C4-2 se sembraron en la parte inferior de cámaras de Boyden. Unos 2 días después, las células C4-2 se sembraron en la cámara superior en medio de control o en medio que contenía 1 µg/ml de anticuerpo contra TSP1 Ab1 (Clon A4.1 de neomarkers, Thermo scientific, Fremont, Ca, EEUU). Cuando se añadió el anticuerpo contra TSP1 Ab1 en la cámara superior, también se añadió a la misma concentración en la cámara inferior. Después de a 18 h de incubación, se contaron las células en migración.

La Figura 2A representa la expresión de TSP1 en células C4-2 tratadas 2 h por vehículo (izquierda) o taspigargina (1 µM) (derecha). La expresión de TSP1 se visualiza por inmunofluorescencia indirecta.

La Figura 2B representa la secreción de TSP1 en el medio de cultivo celular por células C4-2 tratadas durante 2 h por vehículo (izquierda) o taspigargina (1 µM) (derecha). La TSP1 secretada se mide por transferencia de western en el medio de cultivo celular.

La Figura 2C representa la expresión de TSP1 en células C4-2 tratadas durante 2 h con alcanfor a las dosis indicadas. La expresión de TSP1 se visualiza por inmunofluorescencia indirecta.

La Figura 2D representa la secreción de TSP1 en el medio de cultivo celular por células C4-2 tratadas durante 2 h por vehículo o alcanfor a las dosis indicadas. La TSP1 secretada se mide por transferencia de western en el medio de cultivo celular.

La Figura 2E representa el nivel de ARNm de TSP1 en células C4-2 después de 6 h de tratamiento por alcanfor a las dosis indicadas (media ± ETM, n=3). El nivel de ARNm está normalizado a ciclofilina A.

La Figura 2F muestra los niveles de ARNm de TRPV3 (barras negras) y TRPM8 (barras grises) medidos en las líneas celulares indicadas de tumor de próstata. Los resultados (media ± ETM, n>3) están normalizados al nivel de ARNm de ciclofilina A y expresados en unidades arbitrarias.

La Figura 2G representa la detección por transferencia de western de proteína TRPV3 en líneas celulares indicadas de próstata. Se usó tubulina como control de carga.

La Figura 2H representa la expresión de TSP1 y TRPV3 en células C4-2 48 h después de transfección de TRPV3a ARNip.

La Figura 2I representa el nivel de ARNm de TSP1 de células C4-2 transfectadas por los ARNip indicados. Los resultados, normalizados al nivel de ARNm de ciclofilina A se miden 2 días después de la transfección (media ± ETM, n>3).

La Figura 2J representa la capacidad de migración hacia medio fresco de cultivo de células C4-2 transfectadas con los ARNip indicados. Las células se sembraron en la cámara superior 2 días después de la transfección y se contó la cantidad de células que habían migrado 18 h después. Los resultados se expresan como el porcentaje de células en migración en comparación con las células que migran en condiciones de control (media ± ETM, n=3). El experimento se repitió 3 veces con resultados comparables.

La Figura 3A representa los efectos del silenciamiento de TRPM8 y TRPV3 sobre la proliferación de células C4-2. Las células C4-2 se transfectaron con los ARNip indicados. Su proliferación se mide mediante un ensayo metabólico (media ± ETM, n=3, representativo de 3 experimentos separados).

La Figura 3B representa los efectos del silenciamiento de TRPV3 sobre la migración de células C4-2 (barras negras) o PC3 (barras grises). Las células se transfectaron por control, o 2 diferentes TRPV3 ARNip que se indican, y se realizó un ensayo de migración como en la Figura 1G.

La Figura 3C representa la capacidad de migración de células C4-2 transfectadas 2 días antes con un cont- o TRPC4- o TRPC6-ARNip.

La Figura 3D representa la detección por transferencia de Western de TSP1 en el medio de cultivo de células C4-2 transfectadas con cont- o TSP1-ARNip 48 h después de la transfección.

La Figura 3E representa los efectos de TSP1 sobre la capacidad de migración de células C4-2. Las células C4-2 sembradas en la parte inferior de una cámara de Boyden se transfectaron por control- (indicado C), o TSP1-ARNip (TSP). En el mismo día, se transfectó un lote diferente de células por control-, TSP1-, o TRPV3-ARNip (TRP). Tres días después, estas últimas células se trataron con tripsina y se sembraron en la parte superior de la cámara de Boyden como se indica. La migración se cuantificó 18 h después y los resultados se expresaron como un porcentaje de células que migran en condiciones de control (células transfectadas con un control-ARNip en la parte superior e inferior) (media ± ETM, n=3).

La Figura 4A representa los niveles de ARNm de TRPV3 (barras grises claras) y TSP1 (barras grises oscuras) medidos en células C4-2 incubadas en normoxia o en presencia de cloruro de cobalto 300 µM para imitar hipoxia. Los niveles de ARNm se cuantificaron y normalizaron a ciclofilina A. Los resultados se expresan como la proporción de niveles de ARNm en hipoxia con aquellos en normoxia establecida a 1. Se muestran los resultados de 2 experimentos independientes.

La Figura 4B representa la concentración de calcio intracelular en células C4-2 cultivadas en condiciones de control (cont) o en presencia de CoCl₂ 300 µM durante 30 minutos o 48 horas (media ± ETM, n>120 células por condición).

La Figura 4C representa los niveles de ARNm de VEGF y TSP1 en células C4-2 incubadas en 20% (normoxia) o 1% de oxígeno (hipoxia) durante un máximo de 72 h. Las barras grises claras representan VEGF en normoxia; las barras grises oscuras representan VEGF en hipoxia; las barras blancas representan TSP1 en normoxia; las barras negras representan TSP1 en hipoxia. Los resultados están normalizados al nivel de ARNm de ciclofilina A y se expresan en unidades arbitrarias, T0 establecido a 1.

La Figura 4D representa el contenido de proteína VEGF y TSP1 en homogeneizados de células C4-2, medido por ELISA y normalizado al contenido total de proteínas. Las barras grises claras representan VEGF en normoxia; las barras grises oscuras representan el código de colores como en C.

La Figura 4E representa el contenido de proteína VEGF y TSP1 en medio de cultivo de células C4-2, medido por ELISA y normalizado al contenido total de proteínas en homogeneizados celulares. Código de colores como en C.

La Figura 4F representa el contenido de proteína TSP1, Hif 1 alfa y TRPV3 en homogeneizados celulares C4-2 en células cultivadas durante los periodos indicados en normoxia (N) o hipoxia (H). Se usó tubulina como control de carga.

La Figura 4G representa la inducción de niveles de ARNm de VEGF (gris) y TSP1 (negro) normalizada a los niveles de ciclofilina A en células PC3 cultivadas durante los periodos indicados en cloruro de cobalto en comparación con los respectivos niveles de ARNm en medio de control en el mismo momento puntual.

La Figura 4H representa la inmunodetección de TSP1 en células PC3 cultivadas durante 48 h en condiciones de control (N) o en presencia de CoCl₂ 300 µM para imitar hipoxia (H).

La Figura 5A representa el volumen del tumor de ratones que albergan tumores C4-2 de crecimiento exponencial. Los ratones se trataron diariamente con inyecciones i.p. de PBS (triángulos), control- (cuadrados negros) TRPV3- (diamantes grises claros) o TSP1-ARNip (diamantes grises oscuros). Todos los ARNip se diluyeron (120 µg/kg) en PBS. El volumen del tumor se expresa en cm³ (media ± ETM, 6 ratones por grupo).

La Figura 5B representa el volumen del tumor de ratones que albergan tumores PC3 de crecimiento exponencial. Los ratones se trataron diariamente con inyecciones i.p. de control- (cuadrados negros) TRPV3- (diamantes grises claros) o TSP1-ARNip (diamantes grises oscuros). Todos los ARNip se diluyeron (120 µg/kg) en PBS. El volumen del tumor se expresa en cm³ (media ± SEM, 6 ratones por grupo).

La Figura 5C representa los niveles de ARNm de TRPV3 y TSP1, normalizados a ciclofilina A y expresados en unidades arbitrarias, en tumores PC3 recogidos al final del experimento representado en la Figura 5B. El nivel de ARNm de TSP1 se trazó frente al nivel de ARNm de TRPV3 en el mismo tumor de ratones tratados con control-ARNip (cuadrados negros), TRPV3-ARNip (diamantes grises) o TSP1-ARNip (círculos blancos).

La Figura 5D representa el nivel de ARNm de TSP1, normalizado al nivel de ARNm de ciclofilina A, en tumores recogidos al final de los experimentos mostrados en la Figura 5A (C4-2, diamantes) y 5B (PC3, triángulos). Los tumores se trataron por control-ARNip (símbolos negros), o TRPV3-ARNip (símbolos grises claros) o TSP1-ARNip (símbolos grises oscuros).

La Figura 5E representa el nivel de ARNm de TRPV3, normalizado al nivel de ARNm de ciclofilina A, en tumores recogidos al final de los experimentos mostrados en la Figura 4A (C4-2, diamantes) y 4B (PC3, triángulos). Los tumores se trataron por control-ARNip (símbolos negros), o TRPV3-ARNip (símbolos grises claros) o TSP1-ARNip (símbolos grises oscuros).

La Figura 5F representa la cuantificación de la densidad de microvasos (MVD) en puntos calientes de vascularización de tumores C4-2 (barras grises) o PC3 (barras negras) recogidos al final del experimento descrito en la Figura 5A y Figura 5B.

La Figura 5G representa el nivel de ARNm de VEGF, normalizado al nivel de ARNm de ciclofilina A, en tumores recogidos al final de los experimentos mostrados en la Figura 4A (C4-2, diamantes) y 4B (PC3, triángulos). Los tumores se trataron por control-ARNip (símbolos negros), o TRPV3-ARNip (símbolos grises claros) o TSP1-ARNip (símbolos grises oscuros).

La Figura 5H representa el nivel de ARNm de los genes indicados en ratones desnudos sacrificados 5 horas después de una inyección i.p. de PBS (barras negras), o 4000 µg/kg de poly(I:C), un ligando conocido de TLR3 (barras grises oscuras), o TRPV3b-ARNip (barras grises claras) o TSP1a-ARNip (barras blancas) todos diluidos en PBS. El nivel de ARNm de los genes indicados, normalizado a ciclofilina A, se cuantificó por RT-PCR a tiempo real en el bazo. Los resultados (media ± ETM, n=4) se expresan en unidades arbitrarias, normalizadas al valor en controles de PBS establecido a 1.

La Figura 6A representa el nivel de ARNm de TSP1, normalizado al ARNm de actina, en tejidos peritumoral (N) y tumoral (T) de muestras congeladas de prostatectomía radical de diferentes fases clínicas (pT2, pT3a, pT3b/pT4) tomadas antes de cualquier otro tratamiento. Cada diagrama de recuadros está compuesto por tres líneas horizontales que presentan los percentiles 25º, 50º (mediana), y 75º. Los valores superior e inferior se muestran usando barras de error. El valor P se muestra cuando es significativo.

La Figura 6B representa la comparación del nivel de ARNm de TSP1, normalizado al ARNm de actina, en muestras de pacientes que no mostraban evidencias de recurrencia del tumor durante al menos 30 meses después de cirugía (n=8) o que experimentaban recidiva de PSA (n=11) después de cirugía.

Ejemplos

[0120] Los siguientes ejemplos se han realizado de acuerdo con los procedimientos experimentales descritos a partir de ahora en este documento.

Reactivos y ARNip

[0121] El alcanfor y la taspigargina se adquirieron de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia). Los anticuerpos contra TSP1 (Ab1, Ab-4 y Ab-11) fueron de Neomarkers (Thermo scientific, Fremont, Ca, EEUU), los anticuerpos contra TRPV3 de TEBU (Le Perray en Yvelines, Francia) y la tubulina de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin

Fallavier, Francia). Los anticuerpos de cabra Alexa-Fluor anti-conejo 488 y de cabra Alexa-Fluor anti-ratón 568 se adquirieron en Molecular probes. Los ARNip se adquirieron en Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia). Las secuencias usadas se indican en la tabla 1 suplementaria.

Líneas celulares

5 **[0122]** La línea celular LNCaP es una línea celular de próstata humana dependiente de andrógenos. Expresa el receptor de andrógenos y depende de los andrógenos para su crecimiento.

10 **[0123]** La línea celular C4-2 y 22RV1 son líneas celulares de tumor de próstata humano resistente a castración. Expresan el receptor de andrógenos pero no dependen de los andrógenos para su crecimiento.

[0124] La línea celular PC3 es una línea celular de próstata humana independiente de andrógenos. Las células PC3 no expresan el receptor de andrógenos.

15 *Cultivo celular y transfección*

[0125] Las células LNCaP y C4-2 se cultivaron en RPMI que contenía suero de ternera fetal al 10%, las células PC-3 en DMEM que contenía suero de ternera fetal al 10%. El reactivo Hiperfect (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) se usó para transfectar células en placas de 24 pocillos con los ARNip indicados (10 nM) como se recomienda por el fabricante. Se usó un ensayo de actividad metabólica (WST1, Roche Diagnostics, Meylan Francia) para medir la proliferación celular. Para imitar la hipoxia, las células se cultivaron en presencia de cloruro de cobalto 300 μ M durante 48 h. Para las condiciones hipóxicas, las células se cultivaron a 37°C con CO₂ al 5%, N₂ al 94% y O₂ al 1% en una incubadora hipóxica (Binder GmbH, Tuttlingen, Francia).

25 *Ensayo de migración*

[0126] La capacidad de migración se midió usando una cámara modificada de Boyden. Las células (40.000) se sembraron en RPMI FBS al 1% en la parte superior de un sistema de cultivo celular-cámara-inserto separada de la cámara inferior por una membrana PET de 8 μ m (BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia). Se añadió RPMI FBS al 10%, o medio condicionado en el compartimiento inferior. Dieciocho horas después, las células que no migraron en el compartimiento superior se desecharon usando un hisopo de algodón. Las células en el lado inferior de la membrana se fijaron con metanol a -20°C y se tiñeron con Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia). Las membranas después se escindieron, se montaron en un portaobjetos de vidrio con Glycergel (DAKO) y se contaron las células.

35 *Análisis de ARNip y ARNm por RT-PCR a tiempo real*

[0127] El ARN total se aisló usando reactivo TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia). El ARN se retrotranscribió usando un kit de transcripción inversa a ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia). El ADNc se cuantificó por PCR a tiempo real usando la mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia). Se usó ciclofilina A humana como control interno. Las secuencias de los cebadores de PCR se indican en la tabla 2 suplementaria.

45 *ELISA*

[0128] Los contenidos de proteína TSP1 y VEGF en homogeneizados celulares y sobrenadante se midieron por ELISA (quantikine, R&D, Lille, Francia).

50 *Imágenes de calcio*

[0129] Las imágenes de fluorescencia se realizaron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) que contenía NaCl 142 mM, KCl 5,6 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, Na₂HPO₄ 0,34 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, HEPES 10 mM, y glucosa 5,6 mM. La concentración de calcio citosólico se midió usando células cargadas con Fura-2 (2 μ M) como se ha descrito previamente (Mariot et al., 2002). La concentración de calcio intracelular se obtuvo de la proporción e las intensidades de fluorescencia para cada una de las longitudes de onda de excitación (F340/F380) y a partir de la ecuación de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985).

Animales, inyección de ARNip y ensayos de tumorigenicidad

60 **[0130]** Los estudios que implicaron animales, incluyendo su alojamiento y cuidado, el método de eutanasia y los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con el comité local de ética animal en el Institut Andre Lwoff en Villejuif, Francia. Se inyectaron células tumorales (2X10⁶ células/ratón) por vía subcutánea en matrigel al 50% (v:v) (BD biosciences, Le Pontde Claix, Francia) a ratones desnudos macho de 6-8 semanas de edad y se midieron cada día. Cuando los tumores crecieron exponencialmente, se inyectó i.p. ARNip diluido en PBS en una base diaria (120 μ g/kg). El volumen del tumor se estimó usando la fórmula: longitud x anchura² x 0,5.

Sujetos

[0131] Las muestras de tejido de próstata se obtuvieron de 14 pacientes que experimentaron prostatectomía radical en el Centre Hospitalier Lyon Sud (Lyon, Francia) y 12 del Cochin Hospital (Paris, Francia). Se obtuvo el consentimiento por escrito de cada paciente. Inmediatamente después de la retirada de la próstata, se diseccionaron de forma gruesa pequeños trozos de tejidos por el patólogo, se congelaron instantáneamente y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el análisis en los depósitos de tumores del Centre hospitalier Lyon Sud y del groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent de Paul. Se realizó el análisis histológico de una sección congelada para cada muestra por el mismo patólogo antes de la extracción del ARN. Los fragmentos constituidos completamente de glándulas cancerosas se seleccionaron y llamaron muestras de "tumor", mientras que aquellos que no contenían tejido canceroso se seleccionaron y llamaron "tejido peritumoral".

Ejemplo 1: La expresión de TSP1 se aumenta en células de próstata cancerosas refractarias a hormonas

[0132] El promotor de TSP1 está metilado en la línea celular de próstata dependiente de andrógenos LNCaP (Li et al., 1999) y por consiguiente, los niveles de ARNm y de proteína de TSP1 son muy bajos en estas células (Fig. 1A y Fig. 1B). De forma interesante, se encontró una expresión sostenida de TSP1 en células C4-2, que se establecieron a partir de tumores LNCaP recurrentes en ratones después de castración (Thalmann et al., 1994). También se encontró TSP1 expresado, a niveles de ARNm (Fig. 1A) y proteína (Fig. 1B), en la línea celular de tumor de próstata resistente a castración R22RV1 (Sramkoski et al., 1999), y en la línea celular independiente de andrógenos PC3. Para estudiar la función de TSP1 en células de carcinoma de próstata, se diseñó un primer ARNip para abordar una secuencia completamente conservada entre las secuencias de ratón y humana (TSP1a-ARNip) y se diseñó un segundo para abordar específicamente el ARNm humano (TSP1b-ARNip). En células C4-2, los dos ARNip silenciaron la expresión de TSP1 sobre un 70% a nivel de ARNm (Fig. 1C) y proteína (Fig. 1D), sin efecto sobre la proliferación celular (Fig. 1E) o la apoptosis (Fig. 1F).

Ejemplo 2: TSP1 estimula la migración de células de tumor de próstata

[0133] Se usaron cámaras de Boyden para estudiar el papel potencial de TSP1 sobre la migración de células de tumor de próstata. El silenciamiento de TSP1 inhibió fuertemente la migración de células C4-2 (Fig. 1G). Este efecto no fue dependiente de la expresión del receptor de andrógenos porque la migración de células PC3 también estaba fuertemente afectada por el silenciamiento de TSP1 (Fig. 1G). A la inversa, la migración de células LNCaP, que no expresan TSP1, se estimuló cuando las células migraban hacia medio condicionado de células C4-2 (Fig. 1H). Para establecer adicionalmente el papel de TSP1 sobre la migración de células de tumor de próstata, se usó una línea celular, JT8, donde la producción de TSP1 está bajo el control de un promotor reprimible por tetraciclina (Filleur et al., 2001). El medio condicionado de las células JT8 se preparó en presencia de doxiciclina para reprimir la expresión de TSP1, o en su ausencia para inducir la expresión de TSP1 (Fig. 1I). Entonces se midió la migración de células C4-2 hacia estos dos medios. La presencia de TSP1 aumentó fuertemente la capacidad de las células de migrar (Fig. 1J).

[0134] La actividad de TSP1 está mediada por varios tipos de receptores, en particular integrinas que comprenden las subunidades $\beta 1$ o $\beta 3$, y el receptor CD36. La unión de TSP1 a CD36 ha demostrado mediar los efectos antiangiogénicos de TSP1. En la presente invención, se diseñaron ARNip específicos para abordar respectivamente CD36, integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$. El silenciamiento de $\beta 1$ no tuvo efecto sobre las propiedades de migración de células C4-2 (Fig. 1K). En contraste, el silenciamiento de CD36 o $\beta 3$ redujo fuertemente la migración de C4-2 en el ensayo de Boyden (Fig. 1K). Además, los anticuerpos contra TSP1 que inhiben su unión al receptor CD36 (TSP1 Ab1, clon A4.1) alteraron la migración de células C4-2 (Fig. 1L), lo que demuestra que la unión de TSP1 a CD36 media los efectos antiangiogénicos de TSP1 y su capacidad de inducir la migración.

[0135] Los resultados mencionados anteriormente muestran que TSP1 se expresa a niveles mucho mayores (ARNm y proteína) en células C4-2, 22RV1 y PC3 que en células LNCaP. La transfección de células C4-2 por 10 nM de TSP1a-ARNip o TSP1b-ARNip reduce significativamente el nivel de ARNm (Fig. 1C) y el nivel de proteína (Fig. 1D) de TSP1, sin afectar a la proliferación celular (Figura 1E).

Ejemplo 3: La expresión y secreción de TSP1 están reguladas por calcio en células de tumor de próstata

[0136] TSP1 contiene un dominio de unión a calcio y el calcio afecta al plegamiento de TSP1 (Adams, 2004). La cuestión es si un aumento en la concentración citosólica de calcio en células de tumor de próstata podría regular la expresión y/o secreción de TSP1. Con este fin, se trataron células C4-2 con tapsigargina, un inhibidor de la bomba SERCA, que aumenta la concentración intracelular de calcio (Ca^{++}). Un tratamiento de 2 h con tapsigargina provocó un rápido agotamiento de TSP1 del citosol (Fig. 2A) y secreción en el medio de cultivo (Fig. 2B). Los canales de calcio TRPV2 (Monet et al., 2010), TRPV6 (Fixemer et al., 2003), TRPM8 (Fig. 2J), y TRPV3 (Fig. 2F y 2G) se expresan en células de tumor de próstata. El alcanfor es un agonista bien establecido del canal TRPV3 (Moqrich et al., 2005; Vogt-Eisele et al., 2007) que estimula de forma similar la secreción de TSP1 (Fig. 2C y 2D). Además, un tratamiento de 6 h por alcanfor indujo un aumento dependiente de la dosis en el nivel de ARNm de TSP1 (Figura 2E). Estos resultados establecen que el calcio regula tanto el nivel de ARNm de TSP1 como la secreción en células

de tumor de próstata.

Ejemplo 4: Expresión de canales TRP y regulación de TSP1 en células de tumor de próstata

5 **[0137]** Se analizó la expresión de dos canales TRP, TRPM8 y TRPV3, en líneas celulares de próstata. TRPM8 se expresó en células LNCaP y C4-2 pero fue indetectable en 22RV1 y a un nivel muy bajo solamente en células PC3 (Fig. 2F). En contraste, TRPV3 se expresó en las 4 líneas celulares de próstata (Fig. 2F), incluyendo las células PC3 independientes de andrógenos. El ARNm de TRPV3 estaba regulado positivamente en la línea celular resistente a castración C4-2 en comparación con su línea celular parental dependiente de andrógenos LNCaP. Sin embargo, los resultados de la invención muestran claramente que, a nivel de proteína, TRPV3 se expresa fuertemente en células LNCaP (Fig. 2G). Entonces se analizó si la expresión de canales TRP podía regular la expresión de TSP1. El silenciamiento de TRPV3 redujo la expresión de proteína TSP1 (Fig. 2H). Al menos 4 canales de la familia TRP, TRPV2, TRPV3, TRPV6 y TRPM8, estimulan TSP1, ya que su silenciamiento provocó un nivel reducido de ARNm de TSP1 (Fig. 2I). En contraste, TRPC4 y TRPC6 reprimían TSP1, y su silenciamiento aumentó su nivel de ARNm en células C4-2 (Fig. 2I, 2J). TRPC1, TRPC3 u ORAI no tuvieron efecto significativo sobre la expresión de TSP1 (Fig. 2I).

Ejemplo 5: El canal TRPV3 está implicado en el control de la migración de células cancerosas de próstata

20 **[0138]** Para abordar el posible papel de los canales de calcio TRP sobre la migración, se concentraron los esfuerzos en TRPV3 ya que este canal se expresa bien en células de carcinoma de próstata, independientemente de su dependencia de andrógenos, y porque, en oposición a TRPM8, el silenciamiento de TRPV3 no afecta a la proliferación celular (Fig. 3A), un fenotipo que podría desviar la interpretación de los ensayos de migración. El silenciamiento de TRPV3 desencadenó una inhibición masiva de la migración celular en células C4-2 y PC3 (Fig. 3B). En contraste, los ARNip que abordan TRPC4 o TRPC6 estimularon la migración de células C4-2 (Fig. 3C). Todo junto, estos resultados sugieren fuertemente que los efectos de los canales TRP sobre la migración podrían estar mediados por TSP1.

Ejemplo 6: Los efectos de TRPV3 sobre la migración celular están mediados por TSP1

30 **[0139]** Para estudiar adicionalmente los papeles respectivos de TSP1 y TRPV3 en la migración celular, se transfectaron células C4-2 sembradas en la parte inferior de cámaras de Boyden por control- o TSP1-ARNip. Tres días después, la concentración de TSP1 estaba marcadamente reducida en el medio condicionado de células transfectadas con TSP1-ARNip (Fig. 3D). Después se añadieron en la parte superior de las cámaras células C4-2 transfectadas 3 días antes con control-, TSP1-, o TRPV3-ARNip. En comparación con las condiciones de control (las células transfectadas por ARNip de control en las cámaras superior e inferior), el silenciamiento de TSP1 simultáneamente en los dos compartimientos redujo la migración en un 70% (Fig. 3E). De forma interesante, cuando se silenció TSP1 en un único compartimiento, el superior o inferior, la capacidad de migración se redujo sólo parcialmente, lo que demuestra que el efecto de migración está mediado por la proteína secretada (Fig. 3E).

40 **[0140]** El silenciamiento de TRPV3 en el compartimiento superior reprimió drásticamente la migración de células C4-2 que migran hacia un medio agotado en TSP1. Pero de forma importante, esta inhibición se anuló completamente cuando TSP1 estaba presente en la parte inferior de las cámaras de Boyden (Fig. 3E). Este resultado demuestra que la estimulación por TRPV3 de la migración celular está mediada por TSP1 secretada.

Ejemplo 7: La hipoxia induce la expresión de TRPV3 y TSP1 y aumenta la $[Ca^{2+}]_i$

50 **[0141]** La resistencia a condiciones hipóxicas es una característica común de tumores avanzados. Los niveles de ARNm de TSP1 y TRPV3, y la concentración intracelular de calcio, se analizaron en células C4-2 en condiciones hipóxicas. Un tratamiento de 48 h por cloruro de cobalto 300 μ M, que induce la estabilización de las proteínas Hif1 α e Hif2 α (Yuan et al., 2003) e imita los efectos de la hipoxia, indujo fuertemente los niveles de ARNm de TRPV3 y TSP1 (Fig. 4A).

55 **[0142]** La concentración intracelular de calcio se midió en células C4-2 cultivadas en condiciones de control o en presencia de cloruro de cobalto. Este nivel en reposo, que no se modificó después de 30 min., estaba aumentado en dos veces en células incubadas durante 48 h en presencia de cloruro de cobalto (Fig. 4B).

60 **[0143]** TSP1 se induce por hipoxia en fibroblastos humanos y células de músculo liso vascular (Distler et al., 2007; Favier et al., 2005; Mayuko Osada-Oka, 2008). Para analizar si éste también era el caso en células de tumor de próstata, se cultivaron células C4-2 en un 1% o 20% de oxígeno, y se compararon las expresiones de VEGF y TSP1 en diferentes momentos puntuales hasta 72 h. Se observó un aumento dependiente del tiempo de ARNm tanto de VEGF como de TSP1 en hipoxia a nivel de ARNm (Fig. 4C) como de proteína (Fig. 4D). Tan pronto como en 2 h después de exposición a hipoxia, se indujo la secreción de proteína TSP1 (Fig. 4E). También se indujeron las proteínas TRPV3 e Hif1 α por hipoxia de un modo dependiente del tiempo (Fig. 4F). Asimismo, la exposición de células PC3 a CoCl₂, que imita los efectos de la hipoxia, indujo expresiones de TSP1 a niveles de ARNm (Fig. 4G) y proteína (Fig.4H).

Ejemplo 8: El silenciamiento *in vivo* de TRPV3 o TSP1 inhibe el crecimiento de tumores de próstata resistentes a castración o independientes de andrógenos

[0144] Los datos *in vitro* de la invención establecen que la migración de células C4-2 o PC3 está fuertemente alterada por el silenciamiento de TRPV3 o TSP1, sin afectar a la proliferación o supervivencia celular. Para abordar el papel de TSP1 y TRPV3 *in vivo*, se xenoinjertaron células C4-2 en ratones desnudos. Una vez los tumores estaban creciendo exponencialmente, los ratones se asignaron aleatoriamente para tratamiento y recibieron diariamente inyecciones i.p. de PBS o 120 µg/kg de control-, o TSP1-, o TRPV3-ARNip diluido en PBS e inyectado i.p. El crecimiento de tumores en ratones tratados con TSP1- o TRPV3-ARNip estuvo inhibido significativamente (Fig. 5A). Asimismo, ambos TRPV3- y TSP1-ARNip inhibieron el crecimiento de tumores PC3 xenoinjertados (Fig. 5B).

[0145] En tumores PC3 de control recogidos al final del experimento representado en la Fig. 5B, se observó un elevado grado de correlación ($r^2=0,83$) entre los niveles de ARNm de TRPV3 y TSP1 (Fig. 5C). En comparación con los controles, el tratamiento por TSP1-ARNip disminuyó significativamente el nivel de ARNm de TSP1 en tumores PC3 (Fig. 5C). Es de observar que el silenciamiento de TRPV3 provocó una reducción del nivel de ARNm de TRPV3, pero también una reducción del nivel de ARNm de TSP1 (Fig. 5C). Estos datos confirman que, *in vivo* como *in vitro*, TRPV3 regula la expresión de TSP1.

[0146] En tumores C4-2, el tratamiento por TRPV3- o TSP1-ARNip disminuyó significativamente el correspondiente nivel de ARNm diana en comparación con los controles (Fig. 5D, 5E).

Ejemplo 9: TSP1 aún ejerce propiedades antiangiogénicas en tumores resistentes a castración

[0147] Aunque los tumores C4-2 y PC3 tratados por TSP1- o TRPV3-ARNip eran más pequeños y altamente necróticos, su densidad sanguínea de microvasos (MVD) en regiones no necróticas era significativamente mayor que en controles (Fig. 5F), lo que demuestra que TSP1 aún reprime la angiogénesis en tumores CRCaP y AICaP. La MVD aumentada implicaba una expresión reducida de VEGF en tumores tratados con TSP1-ARNip (Fig. 5G), indicativa de una hipoxia reducida. Este resultado establece que TSP1 aún ejerce propiedades antiangiogénicas en tumores C4-2 y PC3.

Ejemplo 10: Ausencia de inducción de la expresión de interferón o citoquinas inflamatorias

[0148] Para confirmar que los efectos antitumorales observados *in vivo* no estaban ligados a una respuesta inmune no específica, se les dio a los ratones una inyección por vía intraperitoneal de TSP1a-ARNip, o de TRPV3b-ARNip, o de Poly(I:C), un ligando conocido de TLR3, usado como control positivo. Todas las inyecciones se realizaron con una dosis de 4 mg/kg de ARNip diluido en PBS. Cinco horas después de la inyección, los ARNm que codifican varios genes implicados en respuesta inmune innata o en inflamación se cuantificaron por RT-PCR a tiempo real cuantitativa. Solamente el tratamiento por Poly (I:C) induce un aumento significativo de TLR3, TLR7, IL6, IL12b, IFNβ, IFNγ e IP10, mientras que ni TSP1-ARNip ni TRPV3-ARNip a la misma dosificación, 33 veces mayor que la usada en experimentos de tumor, indujeron estos TLR y citoquinas (Fig. 5H). Estos resultados establecen que el efecto antitumoral observado por inyecciones de TSP1-ARNip o TRPV3-ARNip *in vivo* no puede atribuirse a una estimulación de la inmunidad innata.

Ejemplo 11: La expresión de TSP1 está asociada con la fase patológica y la recurrencia cancerosa después de prostatectomía radical

[0149] Se estudió la expresión del ARNm de TSP1 en 26 muestras congeladas de prostatectomía radical de pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado que no recibieron ningún tratamiento de radioterapia y/o ablación hormonal antes de la cirugía. Se analizaron pares de tejido tumoral y peritumoral en 18 muestras. El nivel medio de ARNm de TSP1 fue significativamente mayor en tejido peritumoral que en tumores (Tabla 1), lo que confirma que la expresión de TSP1 está reprimida en tumores no tratados dependientes de andrógenos.

[0150] No hubo asociación significativa entre el nivel de ARNm de TSP1 tumoral o peritumoral y la edad del paciente, el valor de Gleason o el nivel sérico de PSA antes de la cirugía (Tabla 1). En tejido tumoral, el nivel de ARNm de TSP1 era significativamente inferior en pacientes con enfermedad localizada (pT2) en comparación con aquellos con cáncer de próstata localmente avanzado (pT3) (Tabla 1 y Fig. 6A). En tejido peritumoral, hay una tendencia hacia un nivel mayor de ARNm de TSP1 en pacientes con enfermedad en fase superior aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

[0151] De los 26 pacientes incluidos en este estudio, 11 experimentaron recidiva de PSA, mientras que 8, seguidos durante al menos 30 meses después de la cirugía, no mostraron evidencias de recurrencia del tumor. El nivel de ARNm de TSP1, medido en tejido tumoral y peritumoral en el momento de prostatectomía radical, estuvo significativamente asociado con recidiva de PSA (Tabla 1 y Fig. 6B).

Tabla 1

Criterios	Nivel de ARNm de TSP1/actina (u.a.)						
	Tejido peritumoral (N)			Tumor (T)			p T v N
	Nº	Media [intervalo]	P	Nº	Media [intervalo]	P	
Todos los pacientes	18	3,88 [0,26 - 13,54]		26	1,25 [0,20 - 7,15]		0,004
edad							
<=60	8	4,94 [0,49 - 13,54]		13	1,61 [0,20 - 7,15]		0,028
>60	10	3,04 [0,26 - 12,81]	0,197	13	0,90 [0,23 - 2,04]	0,110	0,028
Valor de Gleason							
6	2	0,53 [0,26 - 0,81]		6	1,15 [0,31 - 2,53]		0,191
7	13	4,70 [0,49 - 13,54]	0,139+	15	1,31 [0,20 - 7,15]	0,419+	0,011
>7	3	2,58 [0,82 - 5,02]	0,150+	5	1,20 [0,23 - 2,13]	0,459+	0,118
PSA antes de la cirugía (ng/ml)							
<7	6	5,01 [0,26 - 12,9]		10	1,64 [0,24 - 7,15]		0,063
7-15	6	1,27 [0,49 - 2,17]	0,082°	8	0,95 [0,20 - 2,53]	0,195°	0,219
>15	5	5,44 [0,82 - 13,54]	0,452°	7	1,20 [0,28 - 2,60]	0,306°	0,025
desconocido	1	5,02		1	0,23		
fase							
pT2	4	1,15 [0,49 - 1,51]		8	0,41 [0,20 - 0,93]		0,002
pT3a	5	2,83 [0,26 - 6,31]	0,114*	7	1,40 [0,28 - 2,75]	0,012*	0,098
pT3b	8	5,77 [0,81 - 13,54]	0,085*	10	1,93 [0,33 - 7,15]	0,023*	0,039
pT4	1	5,02		1	0,23		
recidiva del tumor (seguimiento en meses, media [intervalo])							
no 51 [30-64]	6	1,34 [0,26 - 2,10]		8	0,64 [0,30 - 1,41]		0,014
sí 36[6-80]	7	7,46 [0,81 - 13,54]	0,012	10	2,19 [0,23 - 7,15]	0,022	0,007

Referencias

5 [0152]

Abeele, F. V., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C, Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F., y Prevarskaya, N. (2002). Bcl-2-dependent modulation of Ca2+ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. 1, 169-179.

10 Adams, J. C. (2004). Functions of the conserved thrombospondin carboxy-terminal cassette in cell-extracellular matrix interactions and signaling. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36, 1102-1114.

Carlson, C. B., Lawler, J., y Mosher, D. F. (2008). Structures of thrombospondins. Cell Mol Life Sci 65, 672-686.

Carthew, R. W., y Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell 136, 642-655.

15 Colombel, M., Filleur, S., Fournier, P., Merle, C, Guglielmi, J., Courtin, A., Degeorges, A., Serre, C. M., Bouvier, R., Clezardin, P., y Cabon, F. (2005). Androgens repress the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in normal and neoplastic prostate. Cancer Res 65, 300-308.

Filleur, S., Volpert, O. V., Degeorges, A., Voland, C, Reiher, F., Clezardin, P., Bouck, N., y Cabon, F. (2001). In vivo mechanisms by which tumors producing thrombospondin 1 bypass its inhibitory effects. Genes Dev 15, 1373-1382.

20 Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V., y Bonkhoff, H. (2003). Expression of the Ca2+-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. Oncogene 22, 7858-7861.

Fontana, A., Filleur, S., Guglielmi, J., Frappart, L., Bruno-Bossio, G., Boissier, S., Cabon, F., y Clezardin, P. (2005a). Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. Int J Cancer.

25 Fontana, A., Filleur, S., Guglielmi, J., Frappart, L., Bruno-Bossio, G., Boissier, S., Cabon, F., y Clezardin, P. (2005b). Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. International Journal of Cancer 116, 686-691.

Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le, B. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., y Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 6624-6628.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., y Tsien, R. (1985). A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260, 3440-3450.

35 Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L., y Bouck, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. Nat Med 6, 41-48.

Lehen'Ky, V., Flourakis, M., Skryma, R., y Prevarskaya, N. (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca2+/NFAT-dependent pathways. Oncogene 26, 7380-7385.

Li, Q., Ahuja, N., Burger, P. C, e Issa, J. P. (1999). Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. Oncogene 18, 3284-3289.

40 Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M. F., y Prevarskaya, N. (2002). Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type Calcium Channel during Neuroendocrine Differentiation of Human Prostate Cancer Cells. J

- Biol Chem 277, 10824-10833.
- Monet, M., Lehen'kyi, V., Gackiere, F., Firlej, V., Vandenberghe, M., Roudbaraki, M., Gkika, D., Pourtier, A., Bidaux, G., Slomianny, C, et al. (2010). Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* 70, 1225-1235.
- 5 Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Murray, A. N., Spencer, K. S., Andahazy, M., Story, G. M., y Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307,1468-1472. Prevarskaya, N., Zhang, L., y Barritt, G. (2007). TRP channels in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772, 937-946.
- 10 Ren, B., Yee, K. O., Lawler, J., y Khosravi-Far, R. (2006). Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1765, 178-188.
- Roberts, D. D. (2008). Thrombospondins: from structure to therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65, 669-671.
- Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G., 2º, Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., Sy, M. S., Marengo, S. R., Rhim, J. S., Zhang, D., y Jacobberger, J. W. (1999). A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 403-409.
- 15 Thalmann, G. N., Anezinis, P. E., Chang, S. M., Zhau, H. E., Kim, E. E., Hopwood, V. L, Pathak, S., von Eschenbach, A. C, y Chung, L. W. (1994). Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* 54, 2577-2581.
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V. y., Slomianny, C, Beck, B., Mariot, P., Bonnafant, J.-L., et al. (2006). Differential Role of Transient Receptor Potential Channels in Ca²⁺ Entry and Proliferation of Prostate Cancer Epithelial Cells. *Cancer Res* 66, 2038-2047.
- 20 Vogt-Eisele, A. K., Weber, K., Sherkheli, M. A., Vielhaber, G., Panten, J., Gisselmann, G., y Hatt, H. (2007). Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol* 151, 530-540.
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., y Millhorn, D. E. (2003). Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- α and von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor- α . *J Biol Chem* 278, 15911-15916.
- 25 Zhang, X., y Lawler, J. (2007). Thrombospondin-based antiangiogenic therapy. *Microvasc Res* 74, 90-99.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 **[0153]**

<110>CNRS

<120> Oligonucleótidos que inhiben la migración celular

35

<130>IOB 09 BG CNR SPON

<160>42

40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

45

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Derivada del genoma humano

50

<400> 1

ccuugacaac aacguggugt t 21

<210>2

<211> 21

<212> ADN

55

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Derivada del genoma humano

60

<400> 2

caccacguug uugucaaggt t 21

<210>3

<211>21

<212> ADN

65

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 5
 <400> 3
 uacccgagac gauuguaugt t 21
 <210>4
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 4
 cauacaaucg ucucgguat t 21
 20 <210>5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 5
 30 caaggagagc gaacgcauct t 21
 <210>6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 6
 40 gaugcguucg cucuccuugt t 21
 <210>7
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 50 <400> 7
 auguacagcg ucaugaucct t 21
 <210>8
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 60 <400> 8
 ggaucaugac gcuguacaut t 21
 <210>9
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 5
 <400> 9
 ucucugagcg cacuaucac t 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 15
 <400> 10
 ugaauagugc gcucagagat t 21
 20
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 30
 <400>11
 uauuccguuc ggucaucuat t 21
 35
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 45
 <400> 12
 uaugagaccg aacggauat t 21
 <210> 13
 <211>21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 55
 <400> 13
 uacagacagu uuuggaucut t 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 65
 <400> 14
 agauccaaaa cugucuguat t 21
 <210> 15
 <211> 21

<212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Derivada del genoma humano

 <400> 15
 ggagaaucug cugaaggaut t 21

 10 <210> 16

 <211>21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano

 <400> 16
 20 auccuucagc agauucuct t 21

 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 30
 <400> 17
 uaagagucaa ccucaacuat t 21

 <210> 18
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 40
 <400> 18
 uaguugaggu ugacucuat t 21

 <210> 19
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 50
 <400> 19
 ggaagacagg caagaucuct t 21

 <210> 20
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 60
 <400> 20
 65 gagaucuugc cugucucct t 21

<210> 21
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 21
 ccuugacaac aacguggug 19
 10
 <210> 22
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 20
 <400> 22
 caccacguug uugucaagg 19
 <210>23
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 30
 <400> 23
 uacccgagac gauuguaug 19
 <210>24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 40
 <400> 24
 cauacaaucg ucucgggua 19
 45
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 25
 caaggagagc gaacgcauc 19
 55
 <210>26
 <211>19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 26
 gaugcguucg cucuccuug 19
 65

<210> 27
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 27
 10 auguacagcg ucaugauc 19
 <210>28
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 20 <400> 28
 ggaucaugac gcuguacau 19
 <210> 29
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 30 <400> 29
 ucucugagcg cacuaauca 19
 <210>30
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 40 <400> 30
 ugaauagugc gcucagaga 19
 <210>31
 <211> 19
 45 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 50 <400> 31
 uauuccguuc ggucaucua 19
 <210>32
 <211> 19
 55 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 60 <400> 32
 65 uagaugaccg aacggaau 19

<210>33
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 33
 uacagacagu uuuggaucu 19
 <210>34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 20
 <400> 34
 agauccaaaa cugucugua 19
 <210>35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 30
 <400> 35
 ggagaaucug cugaaggau 19
 <210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 40
 <400> 36
 auccuucagc agauucucc 19
 <210> 37
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 50
 <400> 37
 uaagagucaa ccucaacua 19
 <210> 38
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 60
 <400> 38
 uaguugaggu ugacucuua 19

ES 2 525 255 T3

<210> 39
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 <400> 39
 10 ggaagacagg caagaucuc 19
 <210>40
 <211>19
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Derivada del genoma humano
 20 <400> 40
 gagaucuugc cugucuucc 19
 <210> 41
 <211> 5820
 25 <212> ADN
 <213> genoma humano
 <400> 41
 agccgctgcg cccgagctgg cctgcgagtt cagggctcct gtcgctctcc aggagcaacc 60
 tctactccgg acgcacaggc attccccgcg cccctccagc cctcgcgcgc ctcgccaccg 120
 ctcccggccg ccgcgctccg gtacacacag gatccctgct gggcaaccaac agctccacca 180
 tggggctggc ctggggacta ggcgtcctgt tcctgatgca tgtgtgtggc accaacggca 240
 ttccagagtc tggcggagac aacagcgtgt ttgacatctt tgaactcacc ggggccgccc 300
 gcaaggggtc tgggcgcga ctggtgaagg gccccgacc ttccagccca gctttccgca 360
 tcgaggatgc caacctgatc ccccctgtgc ctgatgaaa gttccaagac ctggtggatg 420
 ctgtgcgggc agaaaagggt ttcctcctc tggcatccct gaggcagatg aagaagacc 480
 ggggcacgct gctggccctg gagcggaaag accactctgg ccaggctctc agcgtggtgt 540
 ccaatggcaa ggcgggcacc ctggacctca gcctgaccgt ccaaggaaag cagcacgtgg 600
 30 tgtctgtgga agaagctctc ctggcaaccg gccagtggaa gagcatcacc ctgtttgtgc 660

ES 2 525 255 T3

aggaagacag ggcccagctg tacatcgact gtgaaaagat ggagaatgct gaggttggacg 720
 tccccatcca aagcgtcttc accagagacc tggccagcat cgccagaetc cgcategcaa 780
 aggggggct caatgacaat ttccaggggg tgctgcagaa tgtgaggttt gtctttggaa 840
 ccacaccaga agacatcctc aggaacaaag gctgctccag ctctaccagt gtcctcctca 900
 cccttgacaa caacgtggtg aatggttcca gccctgccat ccgcactaac tacattggcc 960
 acaagacaaa ggacttgcaa gccatctgcg gcctctcctg tgatgagctg tccagcatgg 1020
 tcctggaact caggggcctg cgcaccattg tgaccaogct gcaggacagc atccgcaaag 1080
 tgactgaaga gaacaagag ttggccaatg agctgaggcg gccctccccta tgctatcaca 1140
 acggagttca gtacagaaat aacgaggaat ggactggtga tagctgcact gagtgtcact 1200
 gtcagaactc agttaccatc tgcaaaaagg tgtcctgccc catcatgccc tgcctccaatg 1260
 ccacagttcc tgatggagaa tctgtcctc gctgttggcc cagcgactct gcggacgatg 1320
 gctggtctcc atggtccgag tggacctcct gttctacgag ctgtggcaat ggaattcagc 1380
 agcgcggccg ctctcgcgat agcctcaaca accgatgtga gggctcctcg gtcagacac 1440
 ggacctgcca cattcaggag tgtgacaaga gatttaaca ggatggtggc tggagccact 1500
 ggtcccctg gtcctctgt tctgtgacat gtggtgatgg tgtgatcaca aggatccggc 1560
 tctgcaactc tcccagcccc cagatgaacg ggaaccctg tgaaggcgaa gcgcgggaga 1620
 ccaaagcctg caagaaagac gcctgcccc tcaatggagg ctggggtcct tggtcacat 1680
 gggacatctg ttctgtcacc tgtggaggag ggttacagaa acgtagtctg ctctgcaaca 1740
 accccacacc ccagtttga ggaaggact gcgtggtga tgtaacagaa aaccagatct 1800
 gcaacaagca ggactgtcca attgatgat gccctgtcaa tccctgcttt gccggcgtga 1860
 agtgtactag ctaccctgat ggcagctgga aatgtggtgc ttgtccccct ggttacagt 1920
 gaaatggcat ccagtgacaa gatgttgat agtgcaaga agtgctgat gccctgtca 1980
 accacaatgg agagcaccgg tgtgagaaca cggaccccgg ctacaactgc ctgccctgcc 2040
 ccccacgctt caccggtca cagccctcgg gccaggggtg cgaacatgcc acggccaaca 2100
 aacaggtgtg caagcccgt aaccctgca cggatgggac ccacgactgc aacaagaacg 2160
 ccaagtgcaa ctacctggc cactatagcg accccatgta ccgctgcgag tgcaagcctg 2220
 gtaagctg caatggcacc atctgcgggg aggacacaga cctggatggc tggcccaatg 2280
 agaacctggt gtgcgtggcc aatgcgactt accactgcaa aaaggataat tgccccaacc 2340
 ttcccaactc agggcaggaa gactatgaca aggatggaat tggatgatgcc tgtgatgatg 2400
 acgatgacaa tgataaatt ccagatgaca gggacaactg tccattccat tacaaccag 2460
 ctcagtatga ctatgacaga gatgatgtgg gagacogctg tgacaactgt cctacaacc 2520
 acaaccaga tcaggcagac acagacaaca atggggaag agacgctgt gctgcagaca 2580
 ttgatggaga cggtatcctc aatgaacggg acaactgcca gtacgtctac aatgtggacc 2640

ES 2 525 255 T3

agagagacac tgatatggat ggggttggag atcagtgtga caattgcccc ttggaacaca 2700
 atccggatca gctggactct gactcagacc gcattggaga tacctgtgac aacaatcagg 2760
 atattgatga agatggccac cagaacaatc tggacaactg tccctatgtg cccaatgcca 2820
 accaggtcga ccatgacaaa gatggcaagg gagatgcctg tgaccacgat gatgacaacg 2880
 atggcattcc tgatgacaag gacaactgca gactcgtgcc caatccccgac cagaaggact 2940
 ctgacggcga tggctgaggt gatgcctgca aagatgattt tgaccatgac agtgtgccag 3000
 acatcgatga catctgtcct gagaatgttg acatcagtga gacogatttc cgcogattcc 3060
 agatgattcc tctggacccc aaagggacat cccaaaatga ccctaactgg gttgtacgcc 3120
 atcagggtaa agaactcgtc cagactgtca actgtgatcc tggactcgtc gtaggttatg 3180
 atgagtttaa tgctgtggac ttcagtggca ccttcttcat caacaccgaa agggacgatg 3240
 actatgctgg atttgtcttt ggctaccagt ccagcagccg cttttatgtt gtgatgtgga 3300
 agcaagtcac ccagtcctac tgggacacca acccccagag ggctcagggg tactcgggcc 3360
 tttctgtgaa agttgtaaac tccaccacag ggctcggcga gcacctgcgg aacgcctgt 3420
 ggcacacagg aaacacccct ggccaggtgc gcacctgtg gcctgaccct cgtcacatag 3480
 gctgaaaga tttcacccgc tacagatggc gtctcagcca caggccaaag acgggtttca 3540
 ttagagtggg gatgtatgaa ggaagaaaa tcatggctga ctcaggacc cctctatgata 3600
 aaacctatgc tgggtgtaga ctagggttgt ttgtcttctc tcaagaaatg gtgttctct 3660
 ctgacctgaa atacgaatgt agagatccct aatcatcaaa ttgttgattg aaagactgat 3720
 cataaaccaa tgctggtatt gcacctctg gaactatggg cttgagaaaa cccccaggat 3780
 cacttctcct tggcttcctt cttttctgtg cttgcacag tgtggactcc tagaacgtgc 3840
 gacctgcctc aagaaaatgc agttttcaa aacagactca gcattcagcc tccaatgaat 3900
 aagacatctt ccaagcatat aaacaattgc tttggttcc ttttgaaaa gcctctactt 3960
 gcttcagttg ggaaggtgcc cattccactc tgcctttgtc acagagcagg gtgctattgt 4020
 gaggccatct ctgagcagtg gactcaaaag cattttcagg catgtcagag aaggaggac 4080
 tcaactagaat tagcaaaaa aaccacctg acatcctcct tcaggaacac ggggagcaga 4140
 ggccaaagca ctaaggggag ggcgcatacc cgagacgatt gtatgaagaa aatatggagg 4200
 aactgttaca tgctcggtac taagtctttt tcaggggatt gaaagactat tgctggattt 4260
 catgatgctg actggcgta gctgattaac ccatgtaaat aggcacttaa atagaagcag 4320
 gaaagggaga caaagactgg cttctggact tctcctctga tccccacct tactcatcac 4380
 ctgacgtggc cagaattagg gaatcagaat caaccagtg taaggcagtg ctggtgcca 4440
 ttgcctggtc acattgaaat tgggtgcttc attctagatg tagcttgtgc agatgtagca 4500
 ggaaaaatag aaaaacctacc atctcagtga gcaccagctg cctcccaaaag gaggggcagc 4560

ES 2 525 255 T3

cgtgcttata tttttatggt tacaatggca caaaattatt atcaacctaa ctaaaacatt 4620
 ccttttctct tttttcctga attatcatgg agttttctaa ttctctcttt tggaatgtag 4680
 atttttttta aatgctttac gatgtaaaat atttatTTTT tacttattct ggaagatctg 4740
 gctgaaggat tattcatgga acaggaagaa gegttaaagac tatccatgtc atctttggtg 4800
 agagtcttcg tgactgtaag attgtaaata cagattattt attaactctg ttctgctcgg 4860
 aaatttaggc ttcatacgga aagtgtttga gagcaagtag ttgacattta tcagcaaatc 4920
 tcttgcaaga acagcacaag gaaaatcagt ctaataagct gctctgcccc ttgtgctcag 4980
 agtggatggt atgggattct tttttctctt gttttatctt ttcaagtgga attagttggt 5040
 tatccatttg caaatgtttt aaattgcaaa gaaagccatg aggtcttcaa tactgtttta 5100
 ccccatccct tgtgcatatt tccagggaga aggaaagcat atacactttt ttctttcatt 5160
 tttccaaaag agaaaaaat gacaaaaggt gaaacttaca tacaaatatt acctcatttg 5220
 ttgtgtgact gagtaaagaa tttttggatc aagcggaaag agtttaagtg tctaacaac 5280
 ttaaagctac tgtagtacct aaaaagtcag tgtgtacat agcataaaaa ctctgcagag 5340
 aagtattccc aataaggaaa tagcattgaa atgttaaata caatttctga aagttatggt 5400
 tttttctat catctggtat accattgett ttttttata aattattttc tcattgccat 5460
 tggaaatagat atctcagatt gtgtagatat gctatttaa taatttatca ggaaatactg 5520
 cctgtagagt tagtatttct atttttatat aatgtttgca cactgaattg aagaattggt 5580
 ggttttttct ttttttggtt ttgttttttt tttttttttt ttttgctttt gacctccat 5640
 ttttactatt tgccaatacc tttttctagg aatgtgcttt tttttgtaca catttttate 5700
 cattttacat tctaaagcag tgtaagtgtg atattactgt ttcttatgta caaggaacaa 5760
 caataaatca tatggaaatt tatatttata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5820

<210>42
 <211> 3162
 <212> ADN
 <213> genoma humano

5

<400> 42

gggccccaga catgcggtga tctcagggca agggttgcca cgaccacca gaacctcacc 60
 agccatgaaa gcccaaccca aggagatggt gcctctcatg ggcaagagag ttgctgcccc 120
 cagtgggaac cctgccatcc tgccagagaa gaggccggcg gagatcacc ccacaaagaa 180
 gagtgcacac ttcttctcgg agatagaagg gtttgaacc aaccccacag ttgccaaagc 240
 ctctctcct gtcttctcca agccatgga ttccaacatc cggcagtga tctctggtaa 300
 ctgtgatgac atggactccc ccagctctcc tcaggatgat gtgacagaga ccccatccaa 360
 tcccaacagc ccagtgcac agctggccaa ggaagagcag aggaggaaaa agaggcggct 420
 gaagaagcgc atctttgcag ccgtgtctga gggtgcgtg gaggagtgg tagagttgct 480

10

ES 2 525 255 T3

ggtggagctg caggagcttt gcagggcggc ccatgatgag gatgtgctg acttctcat 540
 gcacaagctg acggcctccg acacgggaa gacctgcctg atgaaggcct tggttaacat 600
 caaccccaac accaaggaga tagtgcgat cctgcttgc tttgctgaag agaacgacat 660
 cctgggcagc ttcacacacg ccgagtacac agaggaggcc tatgaagggc agacggcct 720
 gaacatcgc atcgagcgc gccagggga catcgagcc ctgctcatc ccgcccgc 780
 cgacgtcaac gcgcacgca agggggcctt cttcaacccc aagtaccaac acgaaggcct 840
 ctacttcggt gagacgccc tggcctggc agcatgcacc aaccagccc agattgtgca 900
 gctgctgat gagcacgagc agacggacat cacctcgcg gactcacgag gcaacaacat 960
 ccttcacgc ctggtgacg tggccgagga cttcaagac cagaatgact ttgtgaagc 1020
 catgtaagc atgatcctac tgcggagtgg caactgggag ctggagacca ctgcacaac 1080
 cgatggcctc acgcccctgc agctggcgc caagatggc aaggcggaga tctgaagta 1140
 catcctcagt cgtgagatca aggagaagc gctccggagc ctgtccagga agttcacca 1200
 ctggcgtac ggaccctgt catcctccct ctacgacct accaacgtg acaccaccac 1260
 ggacaactca gtgctgaaa tcactgtca caacaccaac atcgacaacc ggcagatgat 1320
 gctgaccctg gagccctgc acacgtgct gcatatgaag tggagaagt ttgccaaagc 1380
 catgttctt ctgtccttct gcttttattt cttctacaac atcacctga cctcgtctc 1440
 gtaactcgc ccccgggagc aggaggccat ccgcacccc ttggcctga cgcacaagat 1500
 ggggtggctg cagctcctag ggaggatgtt tgtgctcctc tgggcatgt gcatctctgt 1560
 gaaagaggc attgcatct tctgctgag acctcggat ctgcagtca tctctcggc 1620
 tgctggctc cactttgtct ttttatcca agctgtgctt gtgatactgt ctgtctctt 1680
 gtaactgtt gctacaaa agtacctgc ctgctcgtg ctggccatg cctgggctg 1740
 gggaacatg ctctactata cgggggtt ccagtcctg ggcagatca ggcctgatg 1800
 ccagaagtc attttgcag atgtctgaa gttctgtt gtatatatc tgttttgc 1860
 tggatttga gtagccttg cctcgtgat cgagaagtgt cccaaagaca acaaggactg 1920
 cagctcctac ggcagctca gcgacgagc gctggaactc tcaagctca ccataggcct 1980
 gggtagcctg aacatccagc agaactcaa gtatccatt ctcttctgt tctgctcat 2040
 cacctatgtc atcctcacct ttgtctcct cctcaacatg ctcatgtctc tgatggcga 2100
 gactgtgag aacgtctca aggagagcga acgcatctg ccctgcaga gagccaggac 2160
 catcttgag tttgagaaa tgttaccaga atggctgagc agcagatcc ggcagggaga 2220
 gctgtgcaa gtggcggagc atgattccg actgtgttg cggatcaatg aggtgaagtg 2280
 gactgaatg aagacgacg tctcctcct taacgaagc cggggcctg taagacgac 2340
 agatttcaac aaaatccaag attcttccag gaacaacagc aaaaccactc tcaatgcatt 2400
 tgaagaagtc gaggaattcc cggaaacctc ggtgtagaag cggaaaccag agctggtg 2460

ES 2 525 255 T3

cgcgtgcgct gtcctggcgt gcaggcggag tcaccgactc tgtgcagaga ggctttgagg	2520
gatgggtggag tccggctctg ctggcctaga agcagagtgc accctcgtgc tcagtgtca	2580
gtgggtgtct gaactgaggg gcagttgtca atttgtctga gtgggaaaca tcctggattt	2640
tgttacttgg caaacagctg gtgtaaacct acagccagca gcagtctgga gcctgggagc	2700
ctcctgaagt cccgggtgaa gcctctgggt ttaccaattg caggtcggct tggctgggag	2760
agatggatgg cgggaaaggg gcagcagtct tgaggagcag ggagaggagt ctttcctcct	2820
gccagcttc cccgtcagcc ccaaceccag cccacacatt gtaccatctc ttctgctgtg	2880
actgggttgc ctgaatttgt gggagaccoc tgatcccac ccagagtgtg cgggggacgg	2940
aggtaagctg gatatcctgg gggaggaggg gaatgcgctc tggaaacacc cttccggaac	3000
ccttcgggga aaaggagacc atccttggag tgaacgtccc ctgacacccc aaggttcaaa	3060
ctgtctcaag ctgagagatg tttttagtag cagaattaac acagggtttt aacttgaat	3120
acggaaaaga catttcagtt gagaatgaaa attactacaa tg	3162

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso de un oligonucleótido bicatenario elegido entre la pareja (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2), la pareja (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22), la pareja (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4), o la pareja (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24), para la fabricación de un fármaco para la prevención o el tratamiento de tumores primarios o tumores invasivos o metastásicos.
- 10 **2.** Uso de un producto que contiene o consiste en:
- al menos un oligonucleótido bicatenario definido anteriormente en la reivindicación 1,
 - al menos un agente anti-angiogénico y/o un agente anti-tumoral,
- 15 para la fabricación de un producto de combinación para un uso simultáneo, separado o propagado en el tiempo para la prevención o el tratamiento de tumores primarios o tumores invasivos o metastásicos.
- 20 **3.** Oligonucleótido bicatenario para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el fármaco se combina con una terapia anti-tumoral, tal como radioterapia o quimioterapia.
- 25 **4.** Oligonucleótido bicatenario para su uso o producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el tumor primario o el tumor invasivo o metastásico es un tumor sólido o un tumor linfoproliferativo, en el que el tumor sólido es tumor de próstata, un tumor de hígado, adenomas hepáticos, hiperplasia nodular focal, un tumor cerebral tal como glioma, un tumor de mama, un tumor de riñón, un tumor de pulmón tal como carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma pulmonar microcítico, blastoma pleuropulmonar y tumor carcinoide, un tumor óseo tal como osteoma, osteocondroma, quiste óseo por aneurisma, y displasia fibrosa, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma, un cáncer de estómago, un tumor de colon, un tumor de intestino delgado, un tumor esofágico, un tumor pancreático, un sarcoma, un tumor cervical, un tumor de vesícula biliar, un melanoma, y en el que el tumor linfoproliferativo es leucemia, linfoma, o un mieloma múltiple.
- 30 **5.** Composición farmacéutica, que comprende como sustancia activa, al menos un oligonucleótido bicatenario elegido entre las siguientes parejas que consisten en (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2); (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4); (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22); (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24), en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 **6.** Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la sustancia activa se formula para la administración a una dosis en el intervalo de 0,05 a 50 mg/kg, en particular de 0,1 a 20 mg/kg.
- 40 **7.** Composición farmacéutica que comprende, como sustancia activa, un producto que contiene o consiste en:
- al menos un oligonucleótido bicatenario definido anteriormente en la reivindicación 1,
 - al menos un agente anti-angiogénico, y/o un agente anti-tumoral,
- como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o propagado en el tiempo.
- 45 **8.** Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el agente anti-angiogénico se elige entre el grupo que comprende Cilengitida, Vandetanib, Lenalidomida, Talidomida, Trióxido Arsénico, Bevacizumab, anti-VEGFR-1, anti-VEGFR-2, anti-PDGFR, anti-FMS-FLT-3, anti-TK1.
- 50 **9.** Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el agente anti-tumoral se elige entre el grupo que comprende agentes alquilantes, tales como Bendamustina, Temozolomida, Mecloretamina, Ciclofosfamida, Carmustina, Cis-platino, Busulfán, Tiotepa, o Decarbazina, agentes anti-metabolito, tales como Pentostatina, Metotrexato, Pemetrexed, Floxuridina, Fluorouracilo, Citaraina, Mercaptopurina o Tiguanina, antibióticos citotóxicos tales como Rubitecán, Mitomicina C, Daunorrubicina, Doxorrubicina, Bleomicina, Plicamicina, Mitoxantrona HCl, u Oxaliplatino, derivados vegetales, tales como Vinorelbina, BMS 184476, sulfato de Vincristina,
- 55 Vinblastina, Docetaxel taxol.
- 10.** Secuencia oligonucleotídica elegida entre las siguientes secuencias: SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22, SEC ID N° 23, SEC ID N° 24.
- 60 **11.** Oligonucleótidos bicatenarios elegidos entre las siguientes parejas que consisten en (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2); (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4); (SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22); (SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24).

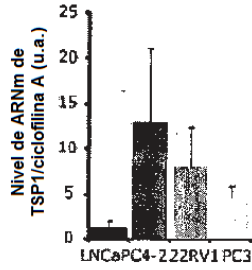


Fig 1A

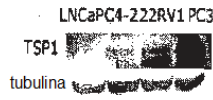


Fig 1B

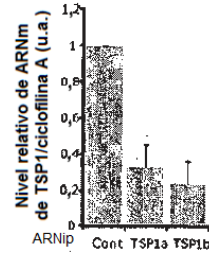


Fig 1C

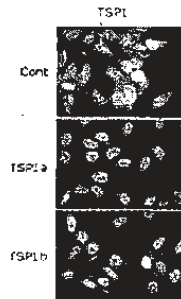


Fig 1D

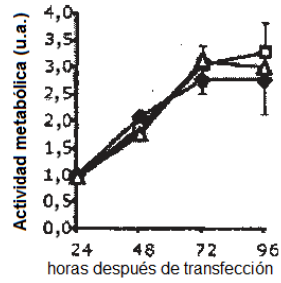


Fig 1E

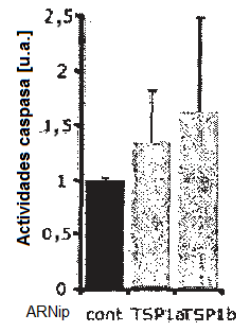


Fig 1F

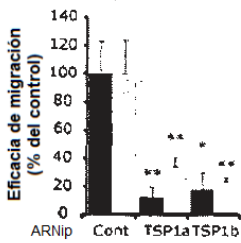


Fig 1G

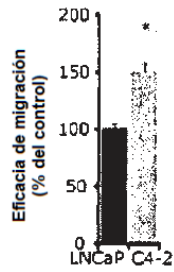


Fig 1H

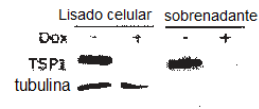


Fig 1I

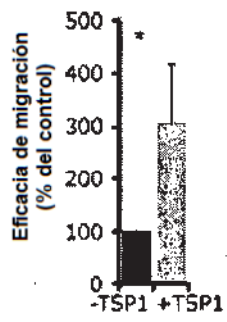


Fig 1J

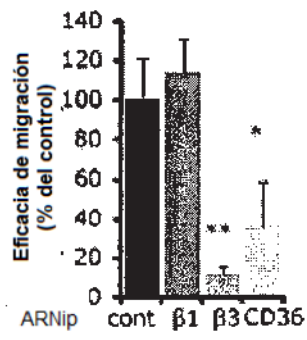


Fig 1K

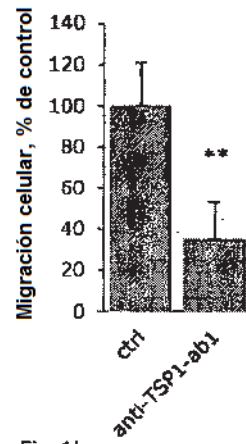


Fig 1L

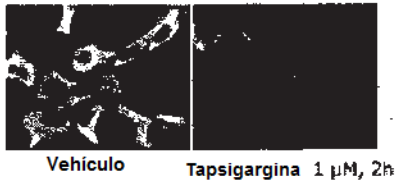


Fig 2A



Fig 2B



Fig 2C

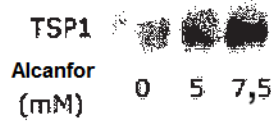


Fig 2D

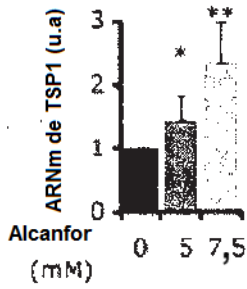


Fig 2E

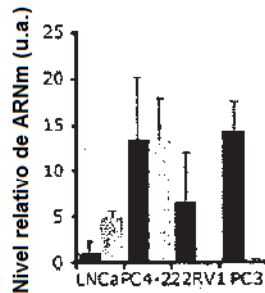


Fig 2F

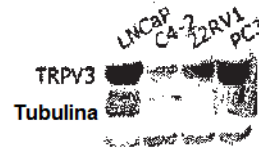


Fig 2G

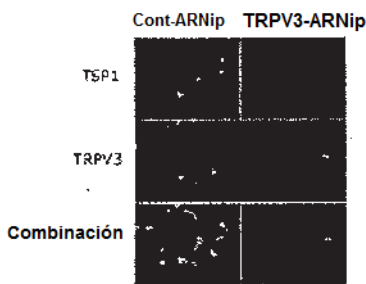


Fig 2H

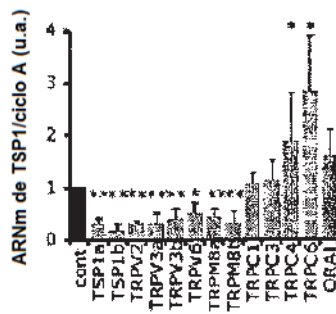


Fig 2I

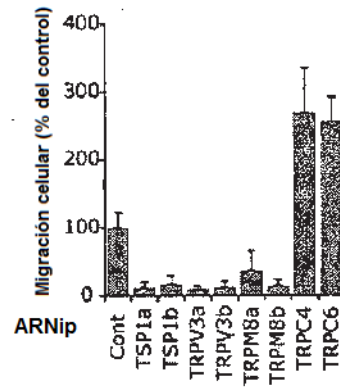


Fig 2J

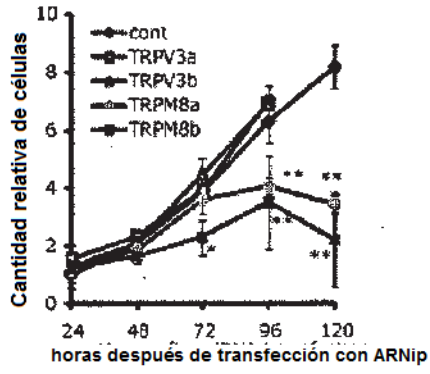


Fig 3A

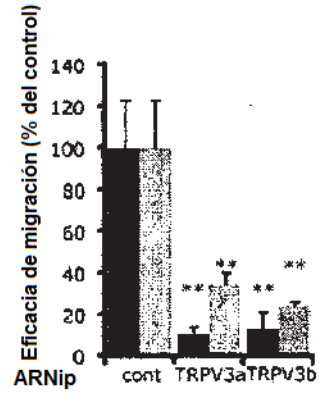


Fig 3B

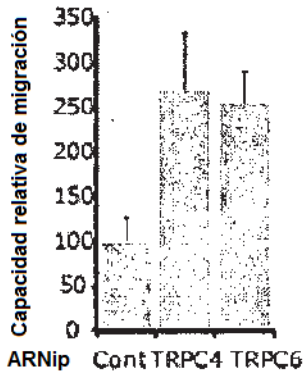


Fig 3C



Fig 3D

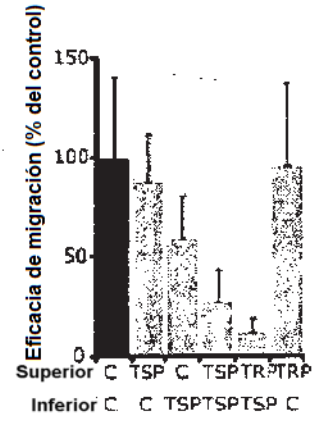


Fig 3E

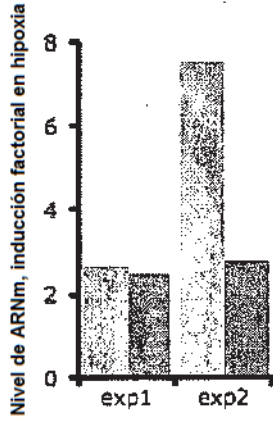


Fig 4A

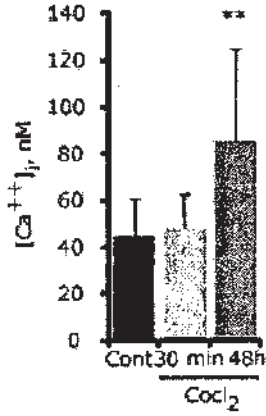


Fig 4B

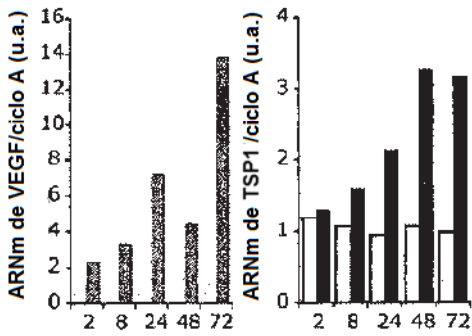


Fig 4C

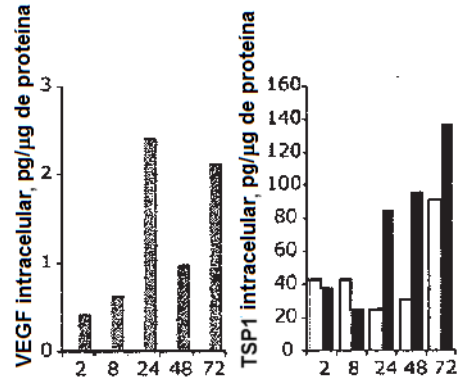


Fig 4D

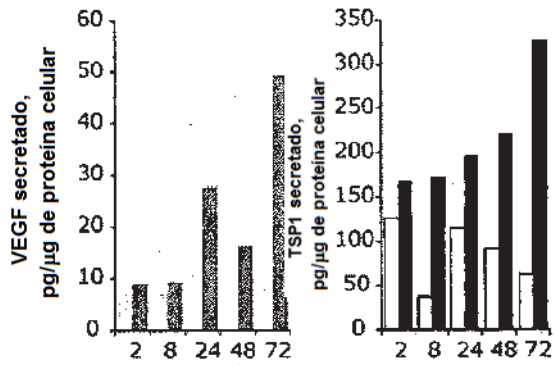


Fig 4E

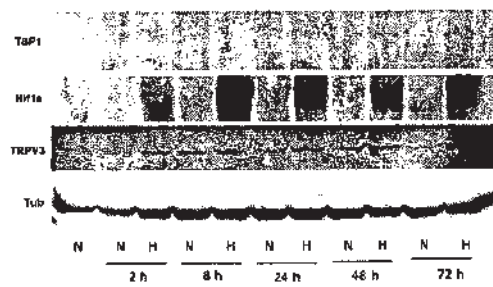


Fig 4F

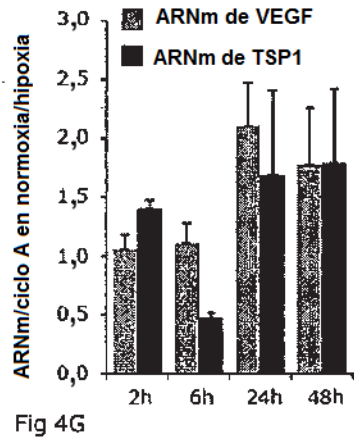


Fig 4G

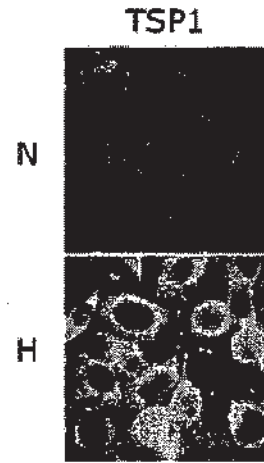


Fig 4H

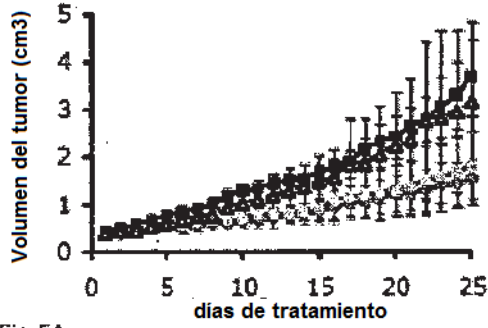


Fig 5A

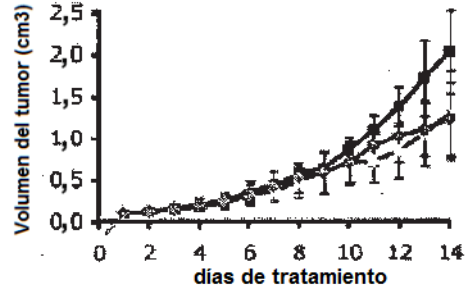


Fig 5B

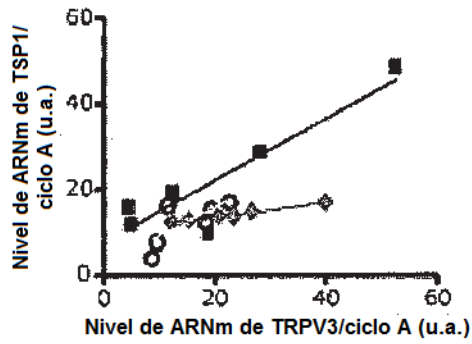


Fig 5C

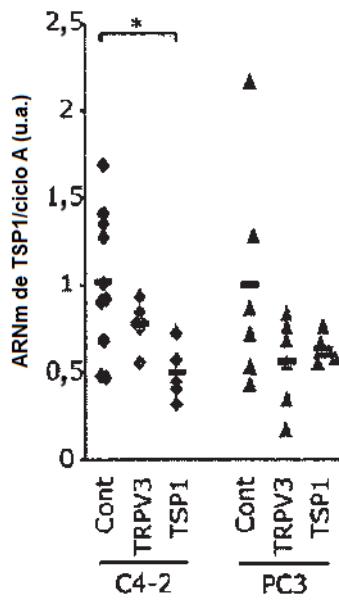


Fig 5D

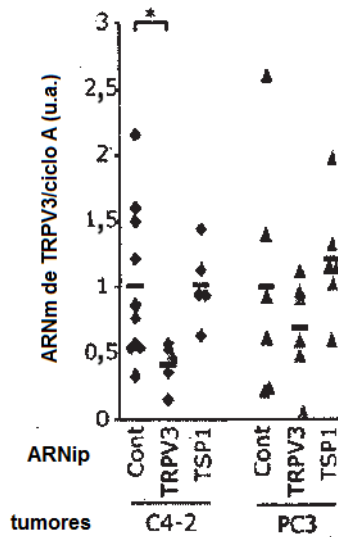


Fig 5E

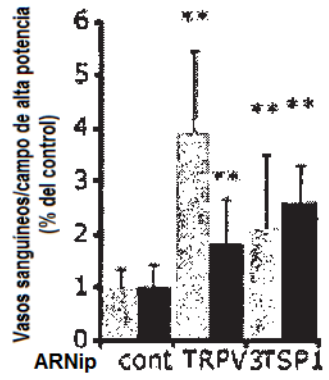


Fig 5F

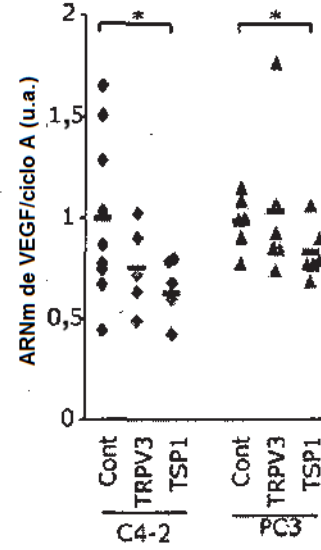


Fig 5G

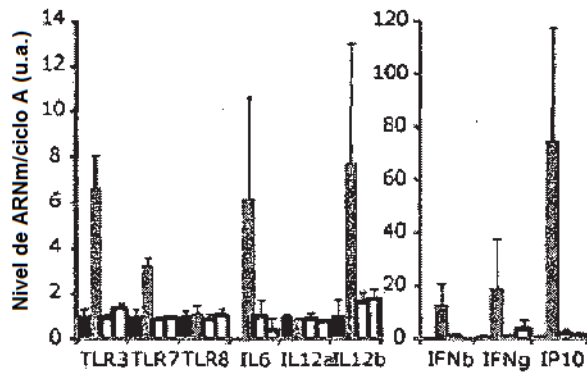


Fig 5H

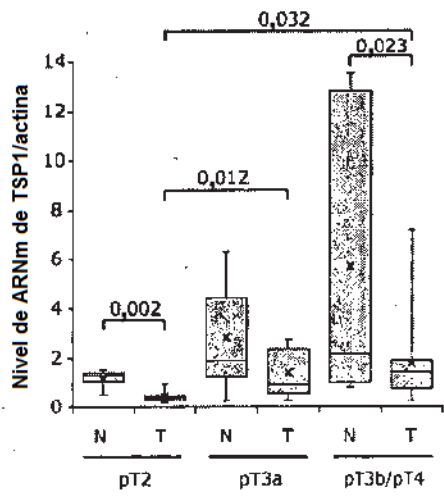


Fig 6A

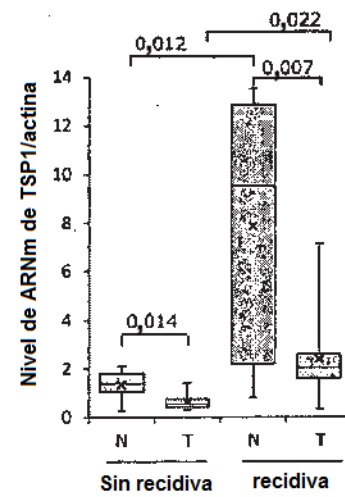


Fig 6B