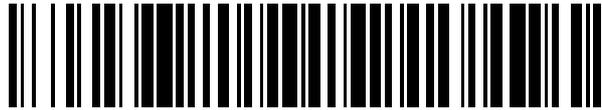


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 153**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 31/4412** (2006.01)  
**A61K 31/513** (2006.01)  
**A61K 31/53** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2010 PCT/JP2010/055521**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10113844**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10758615 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2415870**

54 Título: **Molécula de ARNi para la timidilato sintasa y uso de la misma**

30 Prioridad:

**31.03.2009 JP 2009086463**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.01.2017**

73 Titular/es:

**DELTA-FLY PHARMA, INC. (100.0%)  
37-5, Nishikino, Miyajima, Kawauchi-cho,  
Tokushima-shi  
Tokushima 771-0116, JP**

72 Inventor/es:

**WADA, HIROMI y  
HUANG, CHENG LONG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 599 153 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

Molécula de ARNi para la timidilato sintasa y uso de la misma

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una molécula de ARNi que se dirige a la timidilato sintasa, un agente antitumoral que contiene la molécula de ARNi, un agente para potenciar los efectos antitumorales de un agente antitumoral 5-FU que contiene la molécula de ARNi, y una composición farmacéutica que contiene la molécula de ARNi y el agente antitumoral 5-FU (una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico, en particular).

**Antecedentes de la técnica**

15 Los agentes antitumorales 5-FU, tales como el 5-fluorouracilo (al que se hace referencia de aquí en adelante como "5-FU"), una combinación farmacológica que comprende tegafur y uracilo, o una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico (una composición farmacológica que contiene tegafur, gimeracil, y oteracil potásico en una proporción de 1:0,4:1 en moles, al que se hace referencia de aquí en adelante como "S-1"), se utilizan generalmente en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer del sistema digestivo y el  
20 cáncer pulmonar de células no pequeñas. La timidilato sintasa (a la que se hace referencia de aquí en adelante como "TS") implicada en la síntesis de ADN se conoce como una molécula diana del 5-FU. Se había informado anteriormente la correlación entre el nivel de expresión de TS y la sensibilidad a los agentes antitumorales 5-FU como resultado de muchos ensayos clínicos. Específicamente, los efectos de los agentes antitumorales 5-FU son extraordinarios en los pacientes de cáncer que presentan niveles de expresión de TS relativamente bajos, sin  
25 embargo muchos pacientes de cáncer que presentan niveles de expresión de TS relativamente altos tienen resistencia a los agentes antitumorales 5-FU (Patrick G. Johnston et al., Cancer Res., 1995; 55: 1407-12; Kun-Huei Yeh et al., Cancer, 1998; 82: 1626-31). En consecuencia, se espera el desarrollo de una nueva técnica de tratamiento para el cáncer que potencie los efectos antitumorales de agentes antitumorales 5-FU en los pacientes de cáncer que presentan altos niveles de expresión de TS y son resistentes a los agentes antitumorales 5-FU.

30 También se informó que podía suprimirse la expresión de TS con la utilización de un ARN de interferencia (al que se hace referencia de aquí en adelante como "ARNi"), que se ha desarrollado como una herramienta para suprimir la expresión de un gen determinado (Publicación de Patente JP (Kokai) N° 2005-253342 A). En consecuencia, se han hecho intentos para potenciar los efectos antitumorales de los agentes antitumorales 5-FU por medio de la supresión de la expresión de TS mediante los ARNi, aunque los efectos de la potenciación de los efectos antitumorales no son aún satisfactorios (Kadota et al., the 67° Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008, p. 235, P-4274).

Schmitz et al. (2004) Cancer Research 64,1431-1435 desvelan el TS1058, un ARNip dirigido contra los nucleótidos 1058-1077 de la UTR 3' del ARNm de TS, inmediatamente corriente abajo del codón de parada de traducción. El  
40 TS10589 inhibía potentemente la expresión de TS en las células RKO de cáncer de colon humano y recuperaban la quimiosensibilidad de la línea celular RKO-HTStet resistente a varios compuestos inhibidores.

El documento WO 2008/124927 ejemplifica un dúplex de ARNip dirigido contra los nucleótidos 868-886 del ARNm de TS. Se desvelan otras secuencias diana de ARNip pero no se ejemplifican, que incluyen los nucleótidos 1184-  
45 1203, 1436-1455 y 1081-1100 de la UTR 3'. También se desvelan ARNip pequeños horquillados (ARNhp) pero no se ejemplifican.

**Sumario de la invención**50 **Objetivo a alcanzar por la invención**

La presente invención pretende proporcionar una nueva molécula de ARNi que pueda potenciar notablemente los efectos antitumorales de los agentes antitumorales 5-FU.

55 **Medios para alcanzar el objetivo**

En las circunstancias anteriores, los presentes inventores han llevado a cabo estudios con respecto a una nueva molécula de ARNi que pueda potenciar notablemente los efectos antitumorales de los agentes antitumorales 5-FU. Como resultado, descubrieron una nueva molécula de ARNi que puede suprimir la expresión de TS a un nivel particularmente extraordinario. También, los presentes inventores confirmaron que dicha molécula de ARNi suprimía notablemente la expresión de TS y en consecuencia ejercía efectos antitumorales y potenciaba los efectos antitumorales de los agentes antitumorales 5-FU (en particular, una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico). Esto ha llevado a completar la presente invención.

65 La invención proporciona moléculas de ARNi, vectores, composiciones farmacéuticas y agentes para su uso en métodos de tratamiento médico, que se definen en las reivindicaciones.

### Efectos de la invención

La molécula de ARNi de la presente invención es capaz de suprimir la expresión de TS a un nivel particularmente extraordinario y es capaz de suprimir el crecimiento de tumores que expresan TS. Además, la molécula de ARNi de la presente invención es capaz de potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU (en particular, una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico) a un nivel extraordinario.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama característico que muestra los efectos de ARNip dirigido a TS para suprimir la expresión de TS en líneas celulares DLD-1/5FU de cáncer colorrectal humano.  
La Fig. 2 es un diagrama característico que muestra los efectos antitumorales de ARNhp dirigido a TS, y/o S-1 en ratones que albergan las líneas celulares DLD-1/5FU de cáncer colorrectal humano.

### 15 Realizaciones de la invención

La molécula de ARNi de la presente invención comprende un dominio de ARN de doble cadena compuesto por una cadena con sentido que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1, que se hibrida con una cadena antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2. La molécula de ARNi de la presente invención se dirige a un dominio del ARNm de TS que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la cadena con sentido (a la que se hace referencia de aquí en adelante como el "dominio de ARNm diana"). Por lo tanto presenta acciones de ARNi de manera específica para TS, y puede suprimir la expresión de TS extraordinariamente.

Una cadena con sentido o antisentido que constituya la molécula de ARNi de la presente invención puede comprender una protuberancia en el extremo 3', según se necesite. Los tipos y número de nucleótidos que constituyen dicha protuberancia no están limitados. Por ejemplo, una secuencia de una protuberancia puede consistir en 1 a 5, preferentemente 1 a 3, y más preferentemente 1 a 2 nucleótidos (por ejemplo, TTT, UU, o TT). En la presente invención una "protuberancia" es un nucleótido añadido al final de una cadena que constituye una molécula de ARNi que no tiene un nucleótido en la posición correspondiente de la otra cadena a la que se pueda unir dicha protuberancia complementariamente. Una protuberancia puede ser un nucleótido constitutivo de ADN. Además, una cadena con sentido o antisentido que constituye la molécula de ARNi puede incluir adicionalmente una sustitución, una adición, o una eliminación de 1 a 3 nucleótidos, y más preferentemente 1 o 2 nucleótidos, según se necesite, siempre que no tenga influencia sobre la actividad del ARNi, de manera que se pueda llevar a cabo sin problemas varias operaciones experimentales, tal como la secuenciación genética.

También, el extremo 5' de la cadena con sentido o antisentido puede estar fosforilada, o se puede unir ácido trifosfórico (ppp) al extremo 5', según se necesite.

Ejemplos de las moléculas de ARNi de la presente invención incluyen moléculas de ARN de doble cadena, tales como moléculas de ARNip (ARN de interferencia pequeño) y moléculas de ARNhp (ARN horquillado pequeño), y son preferibles las moléculas de ARNip y ARNhp.

En la presente invención, una molécula de ARNip es una molécula de ARN de doble cadena que resulta de la formación de una región de doble cadena mediante la hibridación de una cadena con sentido con una cadena antisentido.

Se pueden sintetizar *in vitro* la cadena con sentido y la cadena antisentido que constituyen una molécula de ARNip de acuerdo con una técnica conocida, tal como síntesis química o la utilización de un sistema de transcripción que utilice un promotor y una ARN polimerasa. De manera alternativa, se pueden introducir matrices de ADN de la cadena con sentido y la cadena antisentido en un vector de expresión adecuado, y el vector resultante se puede administrar en una célula huésped adecuada para sintetizar *in vivo* las cadenas en sentido y antisentido de interés. Las cadenas en sentido y antisentido que se sintetizan se pueden someter a hibridación mediante un método común conocido en la técnica. Las cadenas en sentido y antisentido sintetizadas se disuelven por separado en un tampón de hibridación para un ARN de doble cadena, cantidades equivalentes (número igual de moles) del mismo se mezclan entre ellas, se calienta la mezcla hasta que la cadena doble se disocia, y el resultado se incuba entonces con enfriamiento gradual. Se lleva a cabo la hibridación, por ejemplo, permitiendo que la mezcla repose a 90 °C durante 1 minuto y luego a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se llevan a cabo una extracción en fenol/cloroformo y una precipitación en etanol, y se puede obtener una molécula de ARNip (es decir, una molécula de ARN de doble cadena).

En la presente invención, una molécula de ARNhp es un ARN de cadena doble que consiste en la cadena con sentido ligada a la cadena antisentido mediante una región enlazadora. Esta consiste en 40 a 60 nucleótidos, la región enlazadora está plegada mediante la formación de un lazo, y la cadena antisentido se hibrida con la cadena con sentido. Por lo tanto se forma una región de doble cadena.

Una región enlazadora contenida en una molécula de ARNhp no está limitada particularmente, y puede ser un polinucleótido o no polinucleótido enlazador, siempre que sea capaz de unir la cadena con sentido a la cadena antisentido para formar una estructura tallo-lazo. Es preferible un polinucleótido enlazador que consiste en 2 a 22

nucleótidos que se conoce en la técnica. Ejemplos específicos incluyen UAGUGCUCUGGUUG (SEQ ID NO: 7), UUCAAGAGA, CCACC, CUCGAG, CCACACC, UUCAAGAGA, AUG, CCC, y UUCG, siendo preferible UAGUGCUCUGGUUG (SEQ ID NO: 7).

5 Una molécula de ARNhp preferible es un ARN de cadena sencilla que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 8.

10 Una molécula de ARNhp se puede sintetizar *in vitro* o *in vivo* de acuerdo con técnicas conocidas como se ha descrito anteriormente. Cuando se sintetiza una molécula de ARNhp, se sintetizan una cadena de ARN sencilla que comprende una cadena con sentido y una cadena antisentido orientadas en direcciones opuestas, y la cadena sencilla de ARN se somete entonces a unión por auto-complementariedad para formar una estructura de cadena doble. De esta manera, se puede obtener una molécula de ARNhp.

15 También se puede obtener una molécula de ARNhp utilizando un vector de expresión que comprende una matriz de ADN que codifica la molécula de ARNhp.

20 Ejemplos de vectores que se pueden utilizar en la presente invención incluyen vectores plásmidos, víricos y no víricos. Ejemplos de vectores plásmidos que se pueden utilizar incluyen los vectores pBAsi, pSUPER, y pBAsi-hU6. Ejemplos de vectores víricos que se pueden utilizar incluyen vectores adenovíricos (por ejemplo, pAxcwit), retrovíricos, y lentivíricos. Un ejemplo de un vector no vírico es un vector liposómico.

25 Un promotor y/u otra secuencia de control está unida operativamente a la matriz de ADN de una molécula de ARNhp y el resultado se inserta en un vector. La expresión "insertado...unido operativamente" se refiere a la unión e incorporación de un promotor y/u otra secuencia de control en el vector, de manera que la molécula de ARNhp se exprese y el ARNm de la TS diana se degrade bajo el control de un promotor y/u otra secuencia de control en una célula en la cual se ha introducido dicho vector. El promotor y/u otra secuencia de control que se puede incorporar en un vector no está limitada particularmente. Se puede seleccionar adecuadamente un promotor y/u otra secuencia de control que se conoce en la técnica, tal como un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, un promotor específico de estadio, un promotor ARNt, un promotor H1, un promotor U6, un promotor polimerasa II, un promotor CMV, y un elemento de control distinto (por ejemplo, una secuencia terminadora que comprende al menos 4 restos de timidina continuos).

30 El vector preparado de esta manera que expresa una molécula de ARNhp es capaz de expresar una molécula de ARNhp y degrada específicamente el ARNm de TS en una célula en la que se ha introducido el vector.

35 La molécula de ARNi de la presente invención se puede administrar por cualquier método, siempre que sea capaz de ejercer sus efectos en el tumor. La molécula de ARNi se puede administrar en el tumor o en la sangre. Cuando la molécula de ARNi de la presente invención se administra en la sangre, la molécula de ARNi se puede modificar por una técnica conocida de modificación de ácidos nucleicos, de tal manera que se evite la degradación de la molécula de ARNi. Además, se pueden emplear sistemas de suministro farmacológico (DDS) tales como liposomas o micelas poliméricas, de manera que el ARNi pueda alcanzar el tumor fácilmente.

40 El vector de expresión de la molécula de ARNhp de la presente invención se puede introducir en una célula mediante, por ejemplo, el transporte mediante un portador mediante un lípido (por ejemplo, el método de la Lipofectamina), el transporte mediado por una sustancia química (por ejemplo, fosfato cálcico), microinyección, implantación con una pistola genética, o electroporación.

45 Los efectos del vector que expresa la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención se puede evaluar utilizando, como indicador, la disminución de los niveles de ARNm o proteínas de TS en células, tejidos, o un individuo en los que se ha introducido dicha molécula o vector, en comparación con los de las células, tejidos, o un individuo en los que no se ha introducido dicha molécula o vector (o aún no se ha introducido). Cuando se va a ensayar el ARNm, se puede ensayar el ARNm mediante hibridación de Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*, u otros medios. Cuando se van a ensayar proteínas, se pueden ensayar las proteínas mediante transferencia de Western, ELISA, ensayo proteico con el uso de un chip proteico al que se ha unido un anticuerpo, o un ensayo de la actividad proteica o por otros medios.

50 El vector que expresa la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención es capaz de disminuir los niveles de expresión proteica o de ARNm de la TS en las células, tejidos, o un individuo en los que dicha molécula o vector se ha introducido, en un 50 % o más, un 60 % o más, un 70 % o más, preferentemente un 80 % o más, y más preferentemente un 90 % o más, en comparación con una muestra de control.

55 El vector que expresa la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención es capaz de ejercer efectos de supresión de la expresión de TS dos, tres, cuatro, cinco, diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, cien, o más veces la eficacia de los vectores que expresan la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp que se conocen en la técnica que se dirigen al ARNm de TS.

60 Se conocen varias técnicas como métodos para seleccionar secuencias de nucleótidos en el dominio de

direccionamiento a ARNm para el diseño de las moléculas de ARNi. Por ejemplo, se puede emplear el Sistema de Apoyo de diseño de ARNi (Takara Bio, Inc.). Sin embargo, se debería señalar que no todas las moléculas de ARNi que tienen secuencias de nucleótidos seleccionadas mediante dicha técnica tienen acciones de ARNi. Por lo tanto, es muy difícil seleccionar moléculas de ARNi de interés que tengan efectos que supriman significativamente la expresión de TS de entre las moléculas candidatas de ARNi que tengan secuencias de nucleótidos seleccionados mediante la técnica que se ha mencionado anteriormente.

El vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp descrito anteriormente se puede utilizar como un principio activo de (a) un agente antitumoral, (b) un agente que potencia los efectos antitumorales de un agente antitumoral 5-FU, y (c) una composición farmacéutica que se utiliza para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

(a) Agente antitumoral

Como se describe en detalle en los ejemplos posteriores, el vector que expresa la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención es capaz de suprimir el crecimiento celular tumoral. Por lo tanto, el vector que expresa la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención se puede utilizar como un agente antitumoral para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

Los cánceres que presentan niveles altos de expresión de TS se pueden tratar con el uso del agente antitumoral de la presente invención. Ejemplos de tales cánceres incluyen, pero no se limitan particularmente a, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer del tracto biliar, cáncer de vesícula y conductos biliares, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cérvix, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, tumor testicular, sarcomas osteogénico y de tejidos blandos, leucemia, linfoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de piel, y tumor cerebral. Ejemplos preferibles son cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, y cáncer de hígado, siendo el cáncer colorrectal particularmente preferible.

El agente antitumoral de la presente invención puede comprender el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención solo o en combinaciones de dos o más. El uso del vector de expresión de la molécula de ARNhp como principio activo del agente antitumoral de la presente invención es preferible por las siguientes razones. A saber, el uso de dicho vector es más rentable que la síntesis de moléculas de ARNi, dicho vector se amplifica tras la introducción en las células, y, las moléculas de ARNhp se pueden producir en masa con estabilidad. Por lo tanto, el uso de dicho vector es cuantitativamente más eficaz que la introducción de moléculas de ARNi. El vector de expresión de ARNhp preferentemente expresa la molécula ARNhp que se representa por SEQ ID NO: 8.

El agente antitumoral de la presente invención puede comprender, además del vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención, sustancias adecuadas que se utilizan en general, tales como vehículos, diluyentes, emulsionantes, excipientes, cargas, aglutinantes, agentes humectantes, desintegrantes, agentes activos de superficie, lubricantes, dispersantes, tampones, conservantes, solubilizantes, antisépticos, colorantes, agentes saborizantes, o estabilizantes.

El agente antitumoral de la presente invención se puede administrar directamente en el cáncer mediante inyección. También se puede administrar por medio de una vía oral o parenteral (por ejemplo, por administración intravenosa, administración intra-arterial, administración tópica, mediante inyección, administración intraperitoneal o intratorácica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración sublingual, administración sublingual, absorción percutánea, o administración intrarrectal).

El agente antitumoral de la presente invención se puede preparar en una forma de dosificación adecuada de acuerdo con la vía de administración. Específicamente, el agente antitumoral se puede preparar en varias formas de dosificación, tales como preparaciones inyectables, suspensiones, emulsiones, ungüentos, cremas, comprimidos, cápsulas, preparaciones granuladas, preparaciones en polvo, píldoras, granulado fino, trociscos, preparaciones farmacológicas para la administración intrarrectal, supositorios oleaginosos, o supositorios solubles en agua.

La cantidad de vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención que se va a incorporar en un agente antitumoral de la presente invención puede variar dependiendo de factores tales como la edad, el peso corporal, o la gravedad de la enfermedad del paciente. Se puede determinar adecuadamente una dosis en el intervalo de 0,0001 mg a 100 mg por kg de peso corporal.

El vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp contenido en el agente antitumoral de la presente invención se puede suministrar al tejido o células diana mediante varias técnicas que se emplean comúnmente en el campo de la terapia genética. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas DDS conocidas tal como las que utilizan liposomas o micelas poliméricas, el transporte mediado por un portador mediante un lípido (por ejemplo, el método de Lipofectamina), el transporte mediado por una sustancia química (por ejemplo, fosfato cálcico), microinyección, implantación con una pistola genética, o electroporación, como se ha descrito anteriormente.

Los efectos del agente antitumoral de la presente invención se pueden evaluar administrando el agente antitumoral a las

células o tejidos originados del cáncer o a individuos afectados por el cáncer, comparando el tamaño del tumor de los mismos con las células, tejidos, o un individuo al que no se ha administrado el agente antitumoral (o que aún no se le ha administrado), y utilizando los resultados de la comparación (es decir, la contracción o eliminación tumoral) como un indicador. Las células cancerosas que se pueden utilizar para la evaluación de los efectos del agente antitumoral de la presente invención no están particularmente limitadas, siempre que expresen la TS. Ejemplos de las mismas incluyen las líneas celulares DLD-1/5FU, KM12C/5FU, y HT29/5FU de cáncer colorrectal humano y la línea celular NUGC-3/5FU de cáncer gástrico humano.

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

(b) Agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU

Se conoce bien en la técnica que los tumores que presentan altos niveles de expresión de TS pueden ser resistentes al agente antitumoral 5-FU (Johnston P. G. et al., *Cancer Res.*, 1995; 55: 1407-12; Yeh K. H. et al., *Cancer*, 1998; 82: 1626-31). Como se describe específicamente en los ejemplos posteriores, el agente para potenciar los efectos del agente antitumoral 5-FU de acuerdo con la presente invención es capaz de suprimir la expresión de TS en dichos tumores y potenciar los efectos de un agente antitumoral 5-FU que se administra.

En la presente invención, los ejemplos de agentes antitumorales 5-FU incluye el 5-FU y un derivado de 5-FU que comprende el 5-FU como un metabolito activo. Un ejemplo de derivado de 5-FU es un agente que contiene tegafur. Un derivado de 5-FU preferentemente es una combinación farmacológica que comprende tegafur. Ejemplos específicos incluyen una combinación farmacológica que comprende tegafur y uracilo, una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico, doxifluridina, capecitabina, y carmofur. Es particularmente preferible la combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico (por ejemplo TS-1 (marca registrada), Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.) que se describe posteriormente

El agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención puede comprender el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención solo o en combinaciones de dos o más. El agente comprende preferentemente el vector de expresión de la molécula de ARNhp. El vector de expresión de ARNhp expresa preferentemente la molécula de ARNhp representada por SEQ ID NO: 8.

La cantidad del vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención contenida en el agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención puede variar dependiendo de factores tales como la edad, peso corporal, o gravedad de la enfermedad del paciente. Una dosis se puede determinar adecuadamente en el intervalo de 0,0001 mg a 100 mg por kg de peso corporal.

El agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención se puede preparar adecuadamente de acuerdo con una técnica conocida, que depende de factores tales como la vía de administración o la diana de administración, como en el caso del agente antitumoral. El vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp contenido en el agente se puede suministrar al tejido o células diana mediante varias técnicas que se emplean comúnmente en el campo de la terapia génica.

Los efectos del agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención puede evaluarse administrando el agente antitumoral 5-FU y el agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención a las células o tejidos que se originan del cáncer o los individuos que padecen un cáncer, comparando el tamaño del tumor del mismo con el de las células, tejidos, o un individuo al que se ha administrado solo el agente antitumoral 5-FU, y utilizando los resultados de la comparación (es decir, contracción o eliminación tumoral) como un indicador. Las células cancerosas que se pueden utilizar para la evaluación de los efectos del agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención no están limitadas particularmente, siempre que se exprese TS. Ejemplos de las mismas incluyen líneas celulares DLD-1/5FU, KM12C/5FU, y HT29/5FU de cáncer colorrectal humano y la línea celular NUGC-3/5FU de cáncer gástrico humano. El agente antitumoral 5-FU y el agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención se pueden administrar simultáneamente o por separado.

Con el uso del agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención en combinación con el agente antitumoral 5-FU, se pueden mejorar los efectos antitumorales de los agentes antitumorales 5-FU, dos, tres, cuatro, cinco, diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, o más veces.

El agente para potenciar los efectos antitumorales del agente antitumoral 5-FU de la presente invención es capaz de potenciar los efectos antitumorales de los agentes antitumorales 5-FU. Por lo tanto, la dosis del agente antitumoral 5-FU necesaria para el tratamiento de los pacientes afectados por los cánceres descritos anteriormente se puede reducir. Esto puede suprimir o retrasar el desarrollo de efectos secundarios que se pueden producir por la administración del agente antitumoral 5-FU. Ejemplos de efectos secundarios incluyen, pero no se limitan a, supresión de médula ósea, anemia

hemolítica, síndrome de coagulación intravascular diseminada, fallo hepático fulminante, deshidratación, enteritis, neumonía intersticial, estomatitis, úlcera del tracto gastrointestinal, hemorragia gastrointestinal, perforación del tracto digestivo, fallo renal agudo, síndrome mucocutáneo ocular, necrosis epidérmica tóxica, trastorno psiconeurótico, pancreatitis aguda, rabdomiolisis, y anosmia.

5

(c) Composición farmacéutica que se utiliza para el tratamiento y/o la prevención del cáncer

La composición farmacéutica que se utiliza para el tratamiento y/o prevención del cáncer de la presente invención comprende, como principios activos, el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención y el agente antitumoral 5-FU. La composición de la presente invención presenta altos niveles de expresión de TS y por lo tanto se puede utilizar para el tratamiento y/o prevención del cáncer que presenta resistencia al agente antitumoral 5-FU.

10

15

20

Los cánceres que presentan altos niveles de TS se pueden tratar con el uso de la composición farmacéutica de la presente invención. Ejemplos de dichos cánceres incluyen, pero no se limitan particularmente a, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer del tracto biliar, cáncer de vesícula y conductos biliares, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cérvix, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, tumor testicular, sarcomas osteogénico y de tejidos blandos, leucemia, linfoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de piel, y tumor cerebral. Ejemplos preferibles son cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer del tracto biliar, y cáncer de hígado, siendo el cáncer colorrectal particularmente preferible.

25

30

El agente antitumoral 5-FU contenido en la composición farmacéutica de la presente invención no está limitado a 5-FU, y un derivado de 5-FU que comprende el 5-FU como metabolito activo está en el ámbito del agente antitumoral 5-FU. Un ejemplo de un derivado de 5-FU es un agente que contiene tegafur. Una combinación farmacológica que comprende tegafur es preferible, y los ejemplos específicos incluyen una combinación farmacológica que comprende tegafur y uracilo, una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico, doxifluridina, capecitabina, y carmofur. Una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico es particularmente preferible.

35

40

El tegafur es un compuesto conocido que se denota como 5-fluoro-1-(1-tetrahidrofuril)-2,4-(1H,3H)-pirimidindiona, se activa *in vivo*, y libera 5-FU, que es una sustancia antitumoral activa. El tegafur se puede preparar de acuerdo con una técnica conocida, tal como el método desvelado en la Publicación de Patente JP (Kokoku) N° S49-10510 B (1974).

El gimeracil es un compuesto conocido que se denota como 2,4-dihidroxi-5-cloropiridina, y no tiene ninguna actividad antitumoral. El gimeracil suprime la inactivación de 5-FU al metabolizarse *in vivo*, y puede potenciar los efectos antitumorales.

El oteracil potásico es un compuesto conocido que se denota como 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-1,3,5-tri-azina-6-carboxilato, y no tiene actividad antitumoral. El oteracil potásico se distribuye principalmente en el tracto gastrointestinal, y suprime la activación de 5-FU en el mismo, para suprimir los trastornos del tracto gastrointestinal.

45

50

Las cantidades preferibles de tegafur, gimeracil, y oteracil potásico que se incorporan en una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico no están limitadas particularmente, siempre que cada compuesto sea capaz de ejercer los efectos de interés. Dichas cantidades pueden ser las mismas que la combinación farmacológica conocida que se desvela en la patente de JP N° 2.614.164. Por ejemplo, aproximadamente de 0,1 a 5 moles, y preferentemente aproximadamente de 0,2 a 1,5 moles de gimeracil, y aproximadamente de 0,1 a 5 moles, y preferentemente se pueden incorporar aproximadamente de 0,2 a 2 moles de oteracil potásico por cada mol de tegafur como cantidad diaria. Preferentemente de manera particular, las cantidades de principios activos (es decir, tegafur, gimeracil, y oteracil potásico) que se incorporan son de 1:0,4:1 en moles. Se hace referencia ocasionalmente en el presente documento a una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico con una proporción de 1:0,4:1 en moles como "S-1".

55

60

65

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp de la presente invención solo o en combinación con dos o más de dichos vectores. La composición farmacéutica preferentemente comprende un vector de expresión de la molécula de ARNhp. Más preferentemente, el vector de expresión de la molécula de ARNhp expresa la molécula de ARNhp representada por SEQ ID NO: 8.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una combinación farmacológica que comprende el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp y tegafur, gimeracil, y oteracil potásico en una proporción de mezcla adecuada (es decir, un fármaco que comprende una pluralidad de principios activos; una preparación de un único principio activo). De manera alternativa, la composición farmacéutica puede estar en forma de un fármaco de múltiples componentes que comprende cualquiera de los principios activos anteriores como un único principio activo (es decir, un fármaco que comprende un solo principio activo) o una combinación farmacológica (es decir, una forma de dosificación de múltiples componentes), de forma que dichos principios activos se pueden utilizar

simultáneamente o por separado. El tegafur, gimeracil, y oteracil potásico se preparan preferentemente en forma de combinación farmacológica en una única forma de dosificación, y el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp se prepara preferentemente en forma de una preparación de un único principio activo.

- 5 Las formas de dosificación de dichas preparaciones farmacológicas no se limitan particularmente y se pueden seleccionar adecuadamente de acuerdo con el fin del tratamiento. Ejemplos específicos incluyen preparaciones orales (por ejemplo, comprimidos, comprimidos recubiertos, polvos, gránulos, cápsulas, y preparaciones líquidas), preparaciones para inyección, supositorios, parches adhesivos cutáneos, y ungüentos. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención está presente en una preparación de múltiples componentes, dicha preparación farmacológica puede tener la misma o diferentes formas de dosificación. Por ejemplo, es preferible que una combinación farmacológica que comprenda tegafur, gimeracil, y oteracil potásico esté en forma de una preparación oral y el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp esté en forma de una preparación inyectable.

15 La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, envasar y distribuir por separado para cada preparación farmacológica, siempre que la combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil, y oteracil potásico se administre en combinación con el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp. De manera alternativa, todas o algunas de las preparaciones farmacológicas se pueden preparar, envasar, y distribuir en una forma de envase único adecuado para la administración de dichos fármacos en combinación (por ejemplo, una formulación en kit).

20 Las preparaciones farmacológicas que comprenden principios activos de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con una técnica conocida con el uso de vehículos farmacológicamente aceptables. Ejemplos de dichos vehículos incluyen varias sustancias que se utilizan en general para las preparaciones farmacológicas, tales como excipientes, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, diluyentes, solubilizantes, agentes suspensores, agentes isotonzantes, modificadores de pH, tampones, estabilizantes, colorantes, agentes saborizantes, y correctores.

30 Ejemplos de excipientes incluyen lactosa, sacarosa, cloruro sódico, glucosa, maltosa, manitol, eritritol, xilitol, maltitol, inositol, dextrano, sorbitol, albúmina, urea, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa cristalina, sílice, metilcelulosa, glicerina, alginato sódico, goma arábiga, y mezclas de cualquiera de los mismos. Ejemplos de lubricantes incluyen talco purificado, estearato, borato sódico, polietilenglicol, y una mezcla de cualquiera de los mismos. Ejemplos de aglutinantes incluyen jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, alcohol polivinílico, éter polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, goma laca, metilcelulosa, etilcelulosa, agua, etanol, fosfato potásico, y una mezcla de cualquiera de los mismos. Ejemplos de desintegradores incluyen almidón seco, alginato sódico, polvo de agar, polvo de laminaria, bicarbonato sódico, carbonato cálcico, ésteres de ácidos grasos sorbitan polioxietileno, laurilsulfato sódico, monoglicérido de ácido esteárico, almidón, lactosa, y una mezcla de cualquiera de los mismos. Ejemplos de diluyentes incluyen agua, alcohol etílico, macrogol, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polietoxilado, ésteres de ácidos grasos sorbitan polioxietileno, y una mezcla de cualquiera de los mismos. Ejemplos de estabilizantes incluyen piro-sulfito sódico, ácido etilendiaminotetraacético, ácido tioglicólico, ácido tioláctico, y una mezcla de cualquiera de los mismos. Ejemplos de agentes isotonzantes incluyen cloruro sódico, ácido bórico, glucosa, glicerina y una mezcla de cualquiera de los mismos. Ejemplos de modificadores del pH y tampones incluyen cloruro sódico, ácido bórico, glucosa, glicerina, y una mezcla de los mismos. Ejemplos de agentes para inyección incluyen hidrocloreuro de procaína, hidrocloreuro de lidocaína y una mezcla de cualquiera de los mismos.

45 Las cantidades de principios activos en la composición farmacéutica de la presente invención que se van a administrar no están particularmente limitadas, siempre que dichos principios activos sean capaces de ejercer los efectos de interés. Dichas cantidades se determinan adecuadamente de acuerdo con la edad, tipo de cáncer, estadio, existencia de metástasis, historia de tratamientos, uso de otros agentes antitumorales, y otras afecciones del paciente. Por ejemplo, la cantidad de tegafur es de 0,2 a 40 mg/kg/día y preferentemente de 0,5 a 20 mg/kg/día, la cantidad de gimeracil es de 0,05 a 12 mg/kg/día y preferentemente de 0,1 a 6 mg/kg/día, la cantidad de oteracil potásico es de 0,2 a 40 mg/kg/día y preferentemente de 0,5 a 20 mg/kg/día, y la cantidad de vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp es 0,0001 a 100 mg/kg/día.

55 El orden e intervalos de administración de los principios activos de la composición farmacéutica de la presente invención no están particularmente limitados, siempre que se consigan los efectos sinérgicos que resultan del uso de tales principios activos en combinación. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se prepara en forma de kit, los fármacos se pueden administrar simultáneamente o por separado.

60 Los efectos de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden evaluar administrando la composición farmacéutica a una célula o tejido que se origina del cáncer mencionado anteriormente o a un individuo que padece dicho cáncer, comparando el tamaño del tumor del mismo con el de la célula o tejido o con el individuo al que no se ha administrado la composición farmacéutica (o aún no se le ha administrado), y utilizando los resultados de la comparación (es decir, la contracción o eliminación del tumor) como un indicador. Las células cancerosas que se pueden utilizar para la evaluación de los efectos de la composición farmacéutica de la presente invención no están particularmente limitadas, siempre que expresen la TS. Ejemplos de las mismas incluyen las líneas celulares DLD-1/5FU, KM12C/5FU, y HT29/5FU de cáncer colorrectal humano y la línea celular NUGC-3/5FU de cáncer gástrico humano.

Los efectos antitumorales de la presente invención no son efectos aditivos que resultan de los efectos antitumorales de cada principio activo. Los efectos antitumorales de la composición farmacéutica de la presente invención pueden ser efectos sinérgicos que resultan de los efectos del agente antitumoral 5-FU por potenciación de la actividad ejercida por el vector de expresión de la molécula de ARNi o la molécula de ARNhp. Los “efectos aditivos” constituyen la suma de los efectos antitumorales ejercidos por cada principio activo, y los efectos aditivos pueden representarse como valores determinados por la multiplicación de las tasas de inhibición del crecimiento tumoral ejercidas por los principios activos como se describe con detalle en los ejemplos posteriores. El término “efectos sinérgicos” se refiere a efectos mayores estadísticamente significativos que los efectos antitumorales aditivos ejercidos por los principios activos. Dichas tasas de inhibición del crecimiento tumoral son significativamente mayores estadísticamente que la tasa de inhibición del crecimiento tumoral que se alcanza por los efectos aditivos de los ingredientes activos como se describe con más detalle en los ejemplos posteriores.

### Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describe con más detalle en referencia a los ejemplos posteriores. Sin embargo, se debería señalar que la presente invención no se limita a estos ejemplos.

#### Ejemplo 1

Identificación de moléculas de ARNip que se dirigen a TS

Se cultivaron líneas celulares DLD-1/5FU de cáncer colorrectal humano (Int. J. Oncol., 2000; 17: 277-83) que se había informado que eran resistentes a 5-FU en una placa de cultivo de 6 cm durante 24 horas hasta que las células alcanzaron de un 50 % a un 60 % de confluencia.

Posteriormente, se sintetizaron químicamente las moléculas de ARNip (es decir, las moléculas de ARNip1-TS (cadena con sentido: SEQ ID NO: 1; cadena antisentido: SEQ ID NO: 2), las moléculas de ARNip2-TS (cadena con sentido: SEQ ID NO: 3; cadena antisentido: SEQ ID NO: 4), y moléculas ARNip3-ES (cadena con sentido: SEQ ID NO: 5; cadena antisentido: SEQ ID NO: 6)) y 2,5 ml de una solución que contenía cada una de las moléculas de ARNip anteriores (con una concentración final de 25 nM) y 25 ml de Reactivo de transfección TransIT-TKO (Mirus) se transfectaron en las células anteriores de acuerdo con una técnica convencional. Se utilizó un ARNip encriptado (Scra1-TS) como un control negativo.

Los efectos de las moléculas de ARNip sobre la inhibición de la expresión de TS se inspeccionaron por medio de una PCR en tiempo real Taqman (Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7700, Applied Biosystems) 72 horas tras la transfección. Se utilizó el ensayo mixto de expresión genética de ensayos bajo pedido (ID del ensayo ID Hs00426591\_m1; tamaño del producto de la PCR 87 pb; Applied Biosystems) para los cebadores y sondas de TS. Se utilizó la GAPDH como referencia inteARN(Sistema de expresión genética de ensayos bajo pedido; ID de ensayo Hs99999905\_m1; tamaño del producto de la PCR: 122 pb; Applied Biosystems).

Los resultados se muestran en la Fig. 1. El TS-ARNip1 a TS-ARNip3 presentaban efectos de inhibición de la expresión de TS, y los efectos de TS-ARNip1 sobre la inhibición de la expresión de TS eran más fuertes que las de TS-ARNip2 y TS-ARNip3 ( $83,5 \pm 1,3 \%$ ).

#### Ejemplo 2

Construcción de un vector adenovirico que expresa una molécula de ARNhp que se dirige a TS

La matriz de ADN de la molécula de ARNhp que se dirige a TS se sintetizó basándose en el TS-ARNip1 (cadena con sentido de TS-ARNip1 (GTAACACCATCGATCATGA, SEQ ID NO: 9), región enlazadora (TAGTGCTCCTGGTTG, SEQ ID NO: 10), cadena antisentido de TS-ARNip1 (TCATGATCGATGGTGTTAC, SEQ ID NO: 11), y terminador polimerasa III (TTTTTT)). Con el fin de preparar un vector plásmido que expresa la molécula de ARNhp que se dirige a TS, se insertó la matriz resultante en un vector plásmido pBasi-hU6 (Takara Bio Inc.) que contenía un promotor humano U6.

Posteriormente, el promotor humano U6 escindido del vector plásmido con *EcoRV* y la matriz se insertaron en el vector cósmido pAxcwit utilizando el kit de Vector de Expresión Adenovirico (Takara Bio Inc.). Se construyó un vector adenovirico deficiente en E1 que expresaba la molécula de ARNhp que se dirige a TS (al que se hace referencia de aquí en adelante como “Ad-shTS”) por el método COS-TPC (Jpn. J. Med. Sci. Biol., 1994; 47: 157-66). Se utilizó como control un vector adenovirico que contenía el gen bacteriano LacZ (al que se hace referencia de aquí en adelante como “Ad-LacZ”) (Oncogene, 2004, 23: 7475-83).

#### Ejemplo 3

Acción de potenciación de los efectos antitumorales de la molécula de ARNhp dirigida a TS sobre TS-1

Fragmentos de líneas celulares DLD-1/5FU de cáncer colorrectal humano subcultivados subcutáneamente que tenían un volumen de aproximadamente 8 mm<sup>3</sup> se trasplantaron en la espalda de ratones desnudos machos de 6 semanas de edad, y cuando el volumen llegó aproximadamente a 200 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en grupos que consistían en 6 individuos. Se inyectó el Ad-shTS (2 x 10<sup>9</sup> ufp) en el tumor cada 4 días durante el periodo de 16 días en el grupo al que se había administrado el Ad-shTS (al que se hace referencia de aquí en adelante como el "grupo Ad-shTS") y en el grupo al que se había administrado Ad-shTS y S-1 (al que se hace referencia de aquí en adelante como el "grupo Ad-shTS+S-1"). Al grupo Ad-shTS+S-1 y al grupo al que se había administrado S-1 (al que se hace referencia de aquí en adelante como "grupo S-1"), se administraron 10 mg/kg de S-1 (Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.) por vía oral administrado una vez al día durante 14 días seguidos. La administración inicial de Ad-shTS se llevó a cabo 2 días antes del inicio de la administración de S-1. Con respecto al grupo de control, se inyectó PBS en el tumor cada 4 días durante un periodo de 16 días.

A partir de entonces, se midió el tamaño del tumor cada 3 días durante un periodo de 30 días, y se inspeccionó el crecimiento tumoral de cada ratón. El volumen tumoral y la tasa de crecimiento tumoral se determinaron utilizando las ecuaciones siguientes.

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

$$\text{Tasa de crecimiento tumoral} = (\text{volumen tumoral el día de la medición}) / (\text{volumen tumoral al inicio de la administración})$$

Los resultados se muestran en la Fig. 2. Mientras que la tasa de crecimiento tumoral del grupo de control era de 44,5 ± 18,0 el día 30, la del grupo Ad-shTS era 22,3 ± 8,2, la del grupo S-1 era 17,4 ± 11,5, la del grupo Ad-shTS+S-1 era 4,7 ± 0,9. Por lo tanto, se encontró que los efectos antitumorales del grupo Ad-shTS+S-1 eran estadísticamente significativamente mayores que los del grupo de control, el grupo Ad-shTS, y el grupo S-1.

La proporción inhibidora del crecimiento tumoral (en %) del grupo Ad-shTS era del 50 % y la del grupo S-1 era del 39 % con respecto al grupo de control (es decir, tasa de crecimiento tumoral de un grupo al que se ha administrado cada agente el día 30 / tasa de crecimiento tumoral del grupo de control el día 30 x 100). Cuando la acción de potenciación de los efectos antitumorales que se conseguía con el uso de Ad-shTS en combinación con S-1 resulta en efectos aditivos, la tasa de inhibición del crecimiento tumoral del grupo Ad-shTS+S-1 con respecto al grupo de control se consideraba que era del 20 %, que se determina multiplicando la proporción inhibidora del crecimiento tumoral del grupo Ad-shTS por el grupo S-1 (es decir, 50 % x 39 % = 20 %). Sin embargo, el valor determinado actualmente era del 11 %. Esto indica que las acciones de potenciación de los efectos antitumorales por el uso de Ad-shTS en combinación con S-1 tenían efectos sinérgicos.

### 35 Aplicabilidad industrial

La molécula de ARNi que se dirige al ARNm de TS de acuerdo con la presente invención es capaz de inhibir el nivel de expresión de TS en las células tumorales y también es capaz de inhibir el crecimiento celular tumoral. Suprimiendo el nivel de expresión de TS con el uso de la molécula de ARNi de la presente invención, los efectos antitumorales de los agentes antitumorales 5-FU se pueden potenciar y se puede tratar y/o prevenir el cáncer eficazmente.

### Listado de secuencias

<110> TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Una molécula de ARNi contra una timidilato sintasa y uso de la misma

<130> PH-4265-PCT

<150> JP 2009-086463

<151> 31-03-2009

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

5      <400> 1  
          guaacaccgau cgaucauga 19

<210>2  
 <211> 19  
 10      <212> ARN  
          <213> Artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

15      <400> 2  
          ucaugaucgaugguguuac      19

<210>3  
 <211> 19  
 20      <212> ARN  
          <213> Artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

25      <400> 3  
          gaauacagag auauggaau      19

<210>4  
 <211> 19  
 30      <212> RNA  
          <213> Artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

35      <400>4  
          auuccauaucucuguauuc 19

<210>5  
 <211> 19  
 40      <212> ARN  
          <213> Artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

45      <400> 5  
          cgaucaugau guagagugu 19

<210>6  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 55      <213> Artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 6  
 60      acacucuaca ucaugaucg 19

<210>7  
 <211> 15  
 <212> ARN  
 65      <213> Artificial

# ES 2 599 153 T3

<220>  
<223> oligonucleótido sintético

5 <400> 7  
uagugcuccu gguug 15

<210>8  
<211> 53  
10 <212> ARN  
<213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido sintético

15 <400> 8  
guaacaccan cgaucan gau agugcuccug guugucan ucgauggugu uac 53

<210>9  
<211> 19  
20 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido sintético

25 <400>9  
gtaacaccat c gatcatga 19

30 <210> 10  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> oligonucleótido sintético

<400> 10  
tagtgctcct ggttg 15

40 <210> 11  
<211> 19  
<212> DNA <  
213> Artificial

45 <220>  
<223> oligonucleótido sintético

<400> 11  
50 tcatgatcga tgggttac 19

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ARNi que es capaz de suprimir la expresión de la timidilato sintasa por la acción de un ARNi que comprende un dominio de ARN de doble cadena compuesto por una cadena con sentido que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1 hibridada con una cadena antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2, en donde la cadena con sentido está unida a la cadena antisentido mediante una región enlazadora.
- 10 2. La molécula de ARNi de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 8.
- 15 3. Un vector que comprende una matriz de ADN de la molécula de ARNi de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y es capaz de expresar la molécula de ARNi.
- 20 4. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de ARNi de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y/o el vector de acuerdo con la reivindicación 3 en combinación con un agente antitumoral 5-FU.
- 25 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el agente antitumoral 5-FU es una combinación farmacológica que comprende tegafur.
- 30 6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el agente antitumoral 5-FU es una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil y oteracil potásico.
- 35 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende tegafur, gimeracil y oteracil potásico en una proporción de 1:0,4:1 en moles.
- 40 8. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que la molécula de ARNi de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y/o el vector de acuerdo con la reivindicación 3 y el agente antitumoral 5-FU están cada uno en una preparación de un único principio activo.
- 45 9. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que la molécula de ARNi de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y/o el vector de acuerdo con la reivindicación 3 y el agente antitumoral 5-FU están en forma de una formulación en kit.
- 50 10. Un agente que comprende la molécula de ARNi de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y/o el vector de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en un método de tratamiento médico.
- 55 11. El agente de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer y/o para su uso en la potenciación de los efectos antitumorales de un agente antitumoral 5-FU.
- 60 12. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el agente antitumoral 5-FU es una combinación farmacológica que comprende tegafur.
- 65 13. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el agente antitumoral 5-FU es una combinación farmacológica que comprende tegafur, gimeracil y oteracil potásico.

Fig. 1

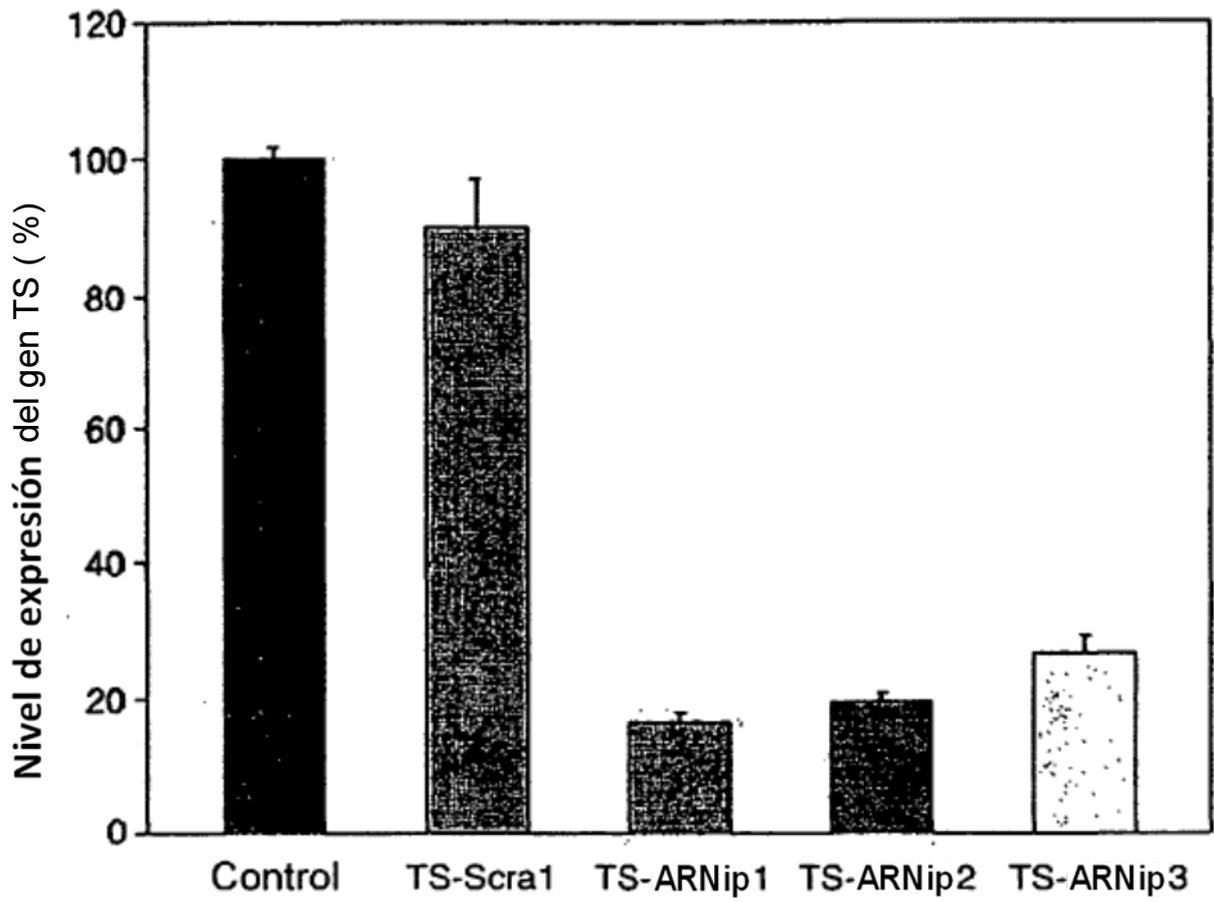


Fig. 2

