

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 742**

51 Int. Cl.:

A61K 31/09	(2006.01) A61K 31/436	(2006.01)
A61K 31/165	(2006.01) A61K 31/4406	(2006.01)
A61K 31/166	(2006.01) A61K 31/444	(2006.01)
A61K 31/245	(2006.01) A61K 31/4725	(2006.01)
A61K 31/282	(2006.01) A61K 33/24	(2006.01)
A61K 31/337	(2006.01) A61K 31/15	(2006.01)
A61K 31/404	(2006.01) A61K 31/5377	(2006.01)
A61K 31/407	(2006.01) A61K 31/517	(2006.01)
A61K 31/4184	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 31/4188	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2012** **PCT/FI2012/050862**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013** **WO13034806**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2012** **E 12762321 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2753316**

54 Título: **Combinación farmacéutica que comprende un agente de silenciamiento de CIP2A para usar en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo, preferiblemente uno con la función p53 deteriorada**

30 Prioridad:

06.09.2011 FI 20115876
06.09.2011 US 201161531337 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2018

73 Titular/es:

TURUN YLIOPISTO (100.0%)
Yliopistonmäki
20014 Turun Yliopisto, FI

72 Inventor/es:

WESTERMARCK, JUKKA y
CVRLJEVIC, ANNA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 650 742 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

Combinación farmacéutica que comprende un agente de silenciamiento de CIP2A para usar en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo, preferiblemente uno con la función p53 deteriorada

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de la combinación de terapias contra el cáncer.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una enfermedad devastadora que afecta a todas las comunidades en todo el mundo. Se ha estimado que 1 de cada 2 hombres y 1 de cada 3 mujeres desarrollarán algún tipo de cáncer en el transcurso de sus vidas.

- 10 Curiosamente, recientemente se estableció que, independientemente de la variabilidad fenotípica entre diferentes tipos de cáncer, la perturbación de un número limitado de elementos genéticos es suficiente para inducir la transformación celular en muchos tipos de células humanas diferentes (revisado en (Zhao et al., 2004)). Experimentalmente, se demostró que la activación de Ras y telomerasa (TERT), junto con la inactivación de las proteínas supresoras de tumores p53 y de la proteína del Retinoblastoma (Rb) pueden inmortalizar una variedad de
- 15 tipos de células humanas, que posteriormente se pueden transformar a un estado tumorigénico en respuesta a la inhibición de la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Por lo tanto, estos elementos genéticos comunes se podrían considerar como reguladores principales del desarrollo del cáncer (Zhao et al., 2004).

- La PP2A es una proteína serina/treonina fosfatasa (PSP) ampliamente conservada que funciona como un complejo proteico trimérico que consiste en una subunidad catalítica (PP2Ac o C), una subunidad de andamiaje (PR65 o A) y una de las subunidades B reguladoras alterativas. Como se describió anteriormente, la evidencia experimental reciente ha establecido firmemente que la inhibición de la actividad de PP2A es un requisito previo para la transformación de células humanas (revisado en (Westermarck and Hahn, 2008)). Sin embargo, se sabe muy poco sobre los mecanismos que regulan la composición y/o la actividad in vivo del complejo PP2A. La identificación de los mecanismos de inhibición de PP2A podrían proporcionar oportunidades para el desarrollo de una nueva clase de
- 20 terapias contra el cáncer que reactiven la actividad supresora tumoral de PP2A. Esta idea sería similar a los enfoques de terapia del cáncer que apuntan a la reactivación de la actividad supresora tumoral de p53 por moléculas pequeñas tales como Nutlin-3 (Vassilev et al., 2004).

- En 2007, se identificó una nueva proteína inhibidora de PP2A denominada inhibidor canceroso de PP2A (CIP2A) (Junttila et al., 2007). CIP2A interactúa con PP2A y con uno de los factores de transcripción oncogénicos más importantes, MYC. Además, la depleción mediada por ARNip de CIP2A aumentó notablemente la actividad de PP2A en el complejo MYC-PP2A y dio como resultado la desfosforilación de serina 62 de MYC y la degradación de la proteína MYC. También se ha demostrado que se requiere CIP2A para el crecimiento celular maligno y para la formación de tumores in vivo (Junttila et al., 2007; Khanna et al., 2009; Westermarck and Hahn, 2008). Además, trabajos recientes han demostrado la sobreexpresión de CIP2A en varios tumores malignos humanos comunes y han validado su papel como oncoproteína humana clínicamente relevante (Khanna et al., 2009; Westermarck and Hahn, 2008). Por lo tanto, estos resultados demuestran que CIP2A es una nueva oncoproteína humana que inhibe PP2A en tumores malignos humanos.

- Chen et al. han descrito en Mol. Cancer Ther. (2011), 10: 892-901 que el uso combinado de bortezomib como agente regulador a la baja de CIP2A y CS-1008, un anticuerpo agonista humanizado contra el receptor de muerte 5 humano, inhibe la proliferación/induce apoptosis en células de carcinoma hepatocelular (HCC). Además, el silenciamiento de CIP2A por ARN corto interferente aumenta la apoptosis inducida por CS-1008 en células HCC, mientras que la expresión ectópica de CIP2A en células HCC suprime la apoptosis inducida por CS-1008, lo que indica que CIP2A juega un papel importante en el efecto sensibilizante de bortezomib a CS-1008. Además, el tratamiento combinado de CS-1008 y bortezomib disminuyó el crecimiento tumoral de forma significativa *in vivo*.

- 45 La muerte celular y/o la apoptosis son los criterios de valoración preferibles para los regímenes de tratamiento del cáncer. Por otro lado, el principal problema relacionado con las quimioterapias utilizadas actualmente es la resistencia intrínseca o la adquirida. Por lo tanto, aunque al menos se han revelado algunos de los mecanismos que subyacen al tumor maligno, existe la necesidad en la técnica del desarrollo de medicamentos para enfermedades hiperproliferativas y especialmente para cáncer.

- 50 La activación de la proteína supresora de tumores p53 media la inducción de la apoptosis de células en respuesta a la variedad de agentes quimioterapéuticos en el uso clínico. (Chari et al., 2009). Sin embargo, como la función de p53 se deteriora en aproximadamente el 50-70% de cánceres humanos, esta es una causa importante de resistencia a la quimioterapia. (Chari et al., 2009). La p53 se inactiva en el cáncer en la mayoría de los casos ya sea por mutaciones genéticas o por sobreexpresión de reguladores negativos de p53 tales como MDM2 o proteínas virales tales como la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV) 16. Por lo tanto, las estrategias que sensibilizan aquellas células cancerosas que albergan p53 funcionalmente deteriorada a la quimioterapia son claramente necesarias para superar la resistencia a los fármacos (Chari et al., 2009).

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de al menos un tipo de agente silenciador de CIP2A seleccionado del grupo que consiste en una molécula de ARNip, una molécula de ARNipD, un precursor de miARN artificial, una molécula de ARNhc, un oligonucleótido antisentido y una ribozima, y al menos un tipo de agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en PKC-412, inhibidor III de PARP, indol-3-carbinol, cisplatino, rapamicina, TGX-221, NU-7441, S31-201 y gemcitabina para su uso como medicamento en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos que comprenden células con función de p53 deteriorada. Los agentes adecuados de cada categoría se exponen en la reivindicación 1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de al menos un tipo de un agente silenciador de CIP2A y un agente quimioterapéutico especificado anteriormente y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un agente silenciador de CIP2A seleccionado del grupo que consiste en una molécula de ARNip, una molécula de ARNipD, un precursor artificial de miARN, una molécula de ARNhc, un oligonucleótido antisentido y una ribozima para su uso en la sensibilización de células hiperproliferativas, con función de p53 deteriorada, a un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en PKC-412, inhibidor III de PARP, indol-3-carbinol, cisplatino, rapamicina, TGX-221, NU-7441, S31-201 y gemcitabina en un sujeto humano o animal que necesita tal sensibilización para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

Además, un aspecto de la presente invención proporciona un método para determinar la sensibilidad a una terapia contra el cáncer en un sujeto que necesita tal terapia, en donde el método comprende evaluar la expresión de CIP2A y p53 y/o su actividad proteica en una muestra obtenida de dicho sujeto, y determinar si un sujeto cuya muestra es negativa para la expresión y/o actividad de CIP2A y con la actividad de p53 deteriorada es sensible a la monoterapia de cáncer por al menos un agente quimioterapéutico, y determinar si un sujeto cuya muestra es positiva para expresión de CIP2A y con la actividad de p53 deteriorada es sensible a la combinación según la presente invención como terapia contra el cáncer.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, dicho agente silenciador de CIP2A comprende tanto una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 25, como secuencias que tienen al menos 80% de identidad de secuencia de dicha SEQ ID NO: 1 a 25 y que conserva su actividad silenciadora de CIP2A.

En algunas realizaciones, de los aspectos anteriores, el trastorno hiperproliferativo a tratar se selecciona de un grupo que consiste en psoriasis, hipertrofia miocárdica, tumores benignos, cánceres sólidos y cánceres hematológicos. Los ejemplos no limitantes de dichos cánceres sólidos incluyen carcinomas de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, glioma, astrocitoma y glioblastoma, mientras que los ejemplos no limitantes de cánceres hematológicos incluyen leucemias y linfomas de células T y células B agudos y crónicos.

Otras realizaciones específicas, objetivos, detalles y ventajas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes, a continuación de los dibujos, la descripción detallada y los ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se describirá con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra el nivel de apoptosis (es decir, actividad de Caspasa 3/7), inducido en la línea celular de glioma derivada de humano, T98G, seguida de la inhibición de CIP2A con ARNip en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar en comparación con las células transfectadas con ARNip de SCR solo.

La Figura 2 muestra la eficacia del ARNip de CIP2A utilizado en combinación con diversos fármacos de quimioterapia para reducir la viabilidad celular como se determina utilizando el ensayo CTG, en la línea celular de cáncer de cuello uterino de origen humano, HeLa, cuando se compara con el ARNip de SCR solo.

La Figura 3 demuestra la eficacia de diversos fármacos quimioterapéuticos para inducir la apoptosis en células de linfoma de ratón primarias derivadas de ratones deficientes en CIP2A (CIP2A^{-/-}) o de ratones que expresan CIP2A (CIP2A^{+/+}), como se determina utilizando el ensayo de Caspasa 3/7.

La Figura 4 demuestra que la viabilidad celular, determinada utilizando el ensayo CTG, se reduce significativamente en células de linfoma primario derivadas de ratones deficientes en CIP2A (CIP2A^{-/-}) en comparación con células que expresan CIP2A, seguido del tratamiento de células con diversos fármacos de quimioterapia.

La Figura 5 es un ensayo de Caspasa 3/7 que mide el nivel de apoptosis (es decir, actividad de Caspasa 3/7) inducida en la línea celular de cáncer gástrico de origen humano, MKN28, seguido de la inhibición de CIP2A con ARNip en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar en comparación con las células transfectadas solo con ARNip de SCR.

La Figura 6 demuestra que la apoptosis (es decir, actividad de Caspasa 3/7) no se induce en la línea celular de cáncer de mama de origen humano, MCF-7, seguida de la inhibición de CIP2A con ARNip en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar en comparación con células transfectadas solo con ARNip de SCR.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en un hallazgo sorprendente de que el silenciamiento del gen CIP2A sensibiliza las células cancerosas comprometidas por la función de la proteína supresora de tumores p53 por la actividad inductora de apoptosis de ciertos agentes quimioterapéuticos de molécula pequeña. El silenciamiento concomitante del gen CIP2A y la administración de dicho agente quimioterapéutico da como resultado un aumento ya sea aditivo o sinérgico en el nivel de apoptosis y/u otro tipo de muerte celular en células en las que la función de p53 se ha inhibido. Por otro lado, la invención muestra que las células de linfoma CIP2A negativas que expresan p53 mutada son más sensibles a la monoterapia con dichos agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una combinación de reducción de CIP2A y dichos agentes quimioterapéuticos para su uso en terapia, mientras que en otro aspecto la invención proporciona un método para determinar la sensibilidad de pacientes con cáncer a quimioterapia mediante la detección del estado de CIP2A y p53 de muestras de pacientes.

El presente método de determinación de la sensibilidad de un sujeto a una terapia contra el cáncer comprende determinar el estado de CIP2A y de p53 de una muestra de tejido canceroso obtenida de dicho paciente. Los pacientes con células cancerosas CIP2A negativas e inactivadas por p53 se determinan como sensibles al tratamiento de monoterapia con agentes quimioterapéuticos, mientras que los pacientes con células cancerosas CIP2A positivas e inactivadas por p53 se determinan como sensibles a la presente combinación, es decir, inhibición de CIP2A junto con la administración de ciertos agentes quimioterapéuticos.

El nivel de CIP2A en una muestra de tejido canceroso o un fluido corporal se puede determinar por diversos medios. Por ejemplo, el nivel de la proteína CIP2A en un tejido o fluido corporal se puede cuantificar mediante i) determinación de la expresión de ARNm de CIP2A a partir de dicho tejido o fluido corporal mediante RT-PCR, o mediante una técnica de hibridación, o ii) sometimiento del tejido o fluido corporal que se espera que contenga la proteína CIP2A a un anticuerpo que reconoce dicho CIP2A, y detección y/o cuantificación de dicho anticuerpo, o sometimiento de dicho tejido o fluido corporal al análisis mediante técnicas de proteómica. Las técnicas de hibridación adecuadas incluyen, por ejemplo, hibridación de ADN y northern blot. La detección o cuantificación del anticuerpo se puede realizar según protocolos de inmunoensayo estándar, tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a marcadores, western blot y métodos inmunohistoquímicos.

La función deteriorada de p53 en una muestra de un tejido canceroso o de un fluido corporal se puede determinar por métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica. El método de elección depende, al menos parcialmente, del mecanismo que subyace a la función de p53 deteriorada. Por ejemplo, la detección de mutaciones de inactivación de p53 se puede realizar mediante técnicas de hibridación o mediante secuenciación de ADN o ARN o mediante análisis de RT-PCR del ARN o ADN, como es bien conocido por una persona experta en la técnica. La sobreexpresión de reguladores negativos de p53 tales como MDM2 o proteínas virales tales como la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV) 16, se puede determinar de la misma manera que el nivel de CIP2A.

El método de estratificación del paciente se puede llevar a cabo determinando el estado de CIP2A y de p53 solo o con el mismo en combinación con otras proteínas o genes.

El silenciamiento génico de CIP2A se puede obtener mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, interferencia por ARN (iARN). El enfoque más común para el silenciamiento génico basado en iARN es el uso de ARN interferente pequeño (ARNip).

El principio de ARNip se presenta extensamente en la bibliografía. Como ejemplos se pueden mencionar las publicaciones de patentes de EE.UU. 2003/0143732, 2003/0148507, 2003/0175950, 2003/0190635, 2004/0019001, 2005/0008617 y 2005/0043266. Una molécula de ARNip bicatenario comprende una región antisentido y una cadena sentido en donde dicha cadena antisentido comprende una secuencia complementaria a una región diana en una secuencia de ARNm que codifica una cierta proteína, y la cadena sentido comprende una secuencia complementaria a dicha cadena antisentido. Por lo tanto, la molécula de ARNip bicatenario se ensambla a partir de dos fragmentos de ácido nucleico en donde un fragmento comprende la cadena antisentido y el segundo fragmento comprende la cadena sentido de dicha molécula de ARNip. En otras palabras, los ARNip son ARN bicatenarios pequeños (ARNbc). La cadena sentido y la cadena antisentido se pueden enlazar covalentemente mediante una molécula ligadora, que puede ser un ligador polinucleotídico o un ligador no nucleotídico. La longitud de las cadenas antisentido y sentido puede variar y es típicamente aproximadamente 19 a 21 nucleótidos cada una. En algunos casos, el ARNip puede comprender 22, 23 o 24 nucleótidos.

Otro enfoque para el silenciamiento de CIP2A basado en iARN es utilizar ARNip sustrato de Dicer (ARNipD) más largos, típicamente de 25-35 nt, que en algunos casos se ha informado que son más potentes que los correspondientes ARNip de 21 mer convencionales (Kim et al. 2005). Los ARNipD se procesan *in vivo* en ARNip activos mediante Dicer.

En una célula, se forma una cadena antisentido de ARNip activa y reconoce una región diana del ARNm diana. Esto a su vez conduce a la escisión del ARN diana mediante el complejo de endonucleasa RISC (RISC = complejo silenciador inducido por ARN) y también en la síntesis de ARN adicional mediante ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), que puede activar Dicer y dar como resultado moléculas bicatenarias de ARNip adicionales, que amplifican así la respuesta.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "ARNbc" se refiere tanto a ARNip como a ARNipD.

Típicamente, pero no necesariamente, tanto la cadena antisentido como la cadena sentido de ARNbc comprenden una protuberancia en el extremo-3' de unos pocos, típicamente de 1 a 3 nucleótidos. La protuberancia 3' puede incluir uno o más nucleótidos modificados, como un 2'-O-metilo ribonucleótido. El extremo 5' de la antisentido es típicamente un grupo fosfato (P). Los ARNbc bicatenarios que tienen grupos fosfato (P) terminales son más fáciles de administrar en la célula que un monocatenario antisentido. En algunos casos, el extremo 5' de la cadena sentido o de ambas cadenas sentido y antisentido puede comprender un grupo P.

El ARN no modificado, normal, tiene baja estabilidad en condiciones fisiológicas debido a su degradación por las enzimas ribonucleasas presentes en la célula viva. Si el oligonucleótido se debe administrar exógenamente, es muy deseable modificar la molécula según métodos conocidos tanto para mejorar su estabilidad frente a la degradación química como a la enzimática.

Las modificaciones de nucleótidos a administrar exógenamente *in vivo* se describen ampliamente en la técnica (p. ej. en el documento de EE.UU. 2005/0255487). Principalmente, se puede modificar cualquier parte del nucleótido, es decir, el azúcar de ribosa, la base y/o los enlaces fosfodiéster internucleotídicos. Por ejemplo, la eliminación del grupo 2'-OH de la unidad de ribosa para dar 2'-desoxirribonucleótidos da como resultado una estabilidad mejorada. También se describen anteriormente otras modificaciones en este grupo: la sustitución del grupo 2'-OH de la ribosa por grupos alquilo, alquenoilo, alilo, alcoxialquilo, halo, amino, azido o sulfhidrilo. También se pueden realizar otras modificaciones en la unidad de ribosa: los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) que contienen enlaces metileno entre las posiciones 2' y 4' de la ribosa se pueden emplear para crear una mayor estabilidad intrínseca.

Además, el enlace fosfodiéster internucleotídico se puede, por ejemplo, modificar de modo que uno o más oxígenos se reemplazan por grupos azufre, amino, alquilo o alcoxi. También se puede modificar la base en los nucleótidos.

Preferiblemente, el oligonucleótido comprende modificaciones de uno o más grupos 2'-hidroxilo en azúcares de ribosa, y/o modificaciones en uno o más enlaces fosfodiéster internucleotídicos, y/o una o más modificaciones de ácido nucleico bloqueado (LNA) entre la posición 2'- y 4'- de los azúcares de ribosa.

Las modificaciones particularmente preferibles son, por ejemplo, el reemplazo de uno o más de los grupos 2'-OH por 2'-desoxi, 2'-O-metilo, 2'-halo, p. ej. fluoro o 2'-metoxietilo. Especialmente preferidos son los oligonucleótidos donde algunos de los enlaces internucleotídicos fosfodiéster también están modificados, p. ej. reemplazados por enlaces fosforotioato.

En algunas realizaciones, los ARNbc pueden contener uno o más análogos de nucleótidos sintéticos o naturales que incluyen, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales y ácidos nucleicos peptídicos (PNA) siempre y cuando los ARNbc conserven su capacidad de silenciamiento de CIP2A.

Se debería enfatizar que las modificaciones mencionadas anteriormente son solo ejemplos no limitantes.

Uno de los desafíos relacionados con iARN es la identificación de un ARNbc potente para el ARNm correspondiente. Se debería mencionar que los genes con complementariedad incompleta están reducidos inadvertidamente por el ARNbc, que conduce a problemas en la interpretación de datos y toxicidad potencial. Sin embargo, esto se puede abordar en parte mediante el diseño cuidadoso de ARNbc apropiados con algoritmos de diseño. Estos programas de ordenador seleccionan una secuencia diana dada con un conjunto de normas para encontrar tramos secuenciales con bajo contenido de GC, una falta de repeticiones internas, una terminación 5 rica en A/U y alta energía de unión libre local, que son características que mejoran el efecto silenciador de ARNbc.

Con el fin de identificar agentes útiles en la presente invención, se diseñaron varios ARNip de CIP2A diferentes utilizando algoritmos comerciales y no comerciales. Con este fin, se cargó la secuencia de ADNc de longitud completa de CIP2A (KI-AA1524) en los programas de algoritmo de ARNip (Eurofins MWG Operon's Online Design Tool) y el programa autónomo desarrollado por Cui et al. (Cui et al., 2004). Además, las secuencias de ARNip generadas por algoritmo se cribaron entonces a través del alineamiento de secuencias de ADN de todo el genoma (BLAST) para eliminar los ARNip que no están libres de desviación. En otras palabras, todos aquellos ARNip que tenían incluso regiones de secuencia corta que coincidían con otros genes distintos del gen diana (CIP2A) se consideraron invaluable para más usos.

Los ARNip obtenidos se transfectaron entonces a diferentes líneas celulares y se estudió su capacidad para degradar ARNm y disminuir más la traducción de CIP2A a nivel de proteína midiendo la cantidad de proteína CIP2A después del tratamiento con ARNip con anticuerpos específicos de CIP2A (Tabla 1).

5 Tabla 1. ARNip específico de CIP2A

SEQ ID NO	Secuencia sentido de ARNip (5' a 3')	% de inhibición de CIP2A (nivel de proteína)
1	5'-AACATAAGTGCTTCACTGATCTT-3'	Moderado
2	5'-AACTGTGGTTGTGTTTGCACCTT-3'	Alto
3	5'-GGUUGCAGAUUCUGAAUUATT-3'	Moderado
4	5-AAUGCCUUGUCUAGGAUUATT-3'	Bajo
5	5'-ACCAUUGAUAUCCUUAGAATT-3'	Alto

Los ARNbc adecuados incluyen aquellos que tienen una identidad de secuencia superior al 80%, p. ej., 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 a 5, siempre y cuando tengan propiedades de unión similares o mejoradas y la actividad de silenciamiento de CIP2A como el ARNbc de referencia.

Los ARNbc aún más específicos de CIP2A adecuados para su uso en diversas realizaciones de la presente invención se pueden diseñar y sintetizar según los métodos conocidos en la técnica. Cualquier ARNbc aislado de este tipo debe ser suficientemente complementario a la secuencia de ADNc de CIP2A para silenciar el gen de CIP2A.

15 Los precursores artificiales de microARN (miARN) son otra clase de ARN pequeños adecuados para mediar iARN. Típicamente, los precursores de miARN artificiales tienen aproximadamente 21-25 nucleótidos de longitud, y pueden tener 1 a 3, típicamente 2, nucleótidos protuberantes en 3'. Los precursores de miARN artificiales silenciadores de CIP2A se pueden diseñar y sintetizar mediante métodos conocidos en la técnica.

20 Los ARN de horquilla corta (ARNhc) son otra forma de silenciar CIP2A. Los ARNhc consisten en i) una secuencia de nucleótidos corta, que oscila típicamente de 19 a 29 nucleótidos, derivada del gen diana; ii) un bucle, que oscila típicamente entre 4 y 23 nucleótidos; y iii) una secuencia de nucleótidos corta inversamente complementaria a la secuencia diana inicial, que oscila típicamente de 19 a 29 nucleótidos. El casete de expresión de ARNhc también puede contener secuencias que aumentan la actividad de interferencia del ARN. Los ejemplos no limitantes de tales secuencias son la secuencia de microARN de 30 mir como se muestra por Silva y col. (Silva et al., 2005).

25 Los ARNhc silenciadores de CIP2A se pueden diseñar y sintetizar por medios y métodos conocidos por una persona experta. Los ejemplos no limitantes de secuencias sentido adecuadas (es decir, secuencias de nucleótidos i) anteriores) para su uso en ARNhc de CIP2A se enumeran en la Tabla 2. Los ARNhc representados en SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 9 están disponibles, p. ej. a partir de Origene, mientras que los ARNhc representados en SEQ ID NO: 10 a SEQ ID NO: 25 están disponibles, p. ej. a partir de Open Biosystems.

30 Tabla 2. Secuencias sentido de ARNhc específicos de CIP2A

SEQ ID NO	Secuencia sentido de ARNip (5' a 3')
6	5'-GATAGCAATGATCCACAGTTTAAGTGGTG-3'
7	5'-CTTTGTGCGGCACAATCTTTCTGTTCAAAC-3'
8	5'-GTACTTGGAGAAAGTATAGCAGCAAACAA-3'
9	5-CAGTTGACCTACTGATGGATCTCCTTAAG-3'
10	5'-CGCAGATTCTGAATTATGCAAA-3'
11	5'-AGCACATAAAGACATTGAGTAA-3'
12	5'-ATTCCTGATAGATCACATTCAA-3'
13	5'-CACGTCAGATAATAGAGAACAA-3'
14	5'-CATGGATGTATATGAAATGAAA-3'
15	5'-CCGGCACAATCTTTCTGTTCAA-3'
16	5'-AGCACATAAAGACATTGAGTAA-3'
17	5'-CGCAAACCTTGCTGCTGATGTAA-3'
18	5'-CCGGCACAATCTTTCTGTTCAA-3'
19	5'-CGCAGCAAGTTGAATCAGAAA-3'
20	5'-CCACAGTTTAAGTGGTGAAA-3'
21	5'-GCTAGTATGTTGAGAGAAGTT-3'
22	5'-GCTAGTAGACAGAGAACATAA-3'
23	5'-GACAGAACTCACACGACTAT-3'
24	5'-CCACAGTTTAAGTGGTGAAA-3'

SEQ ID NO	Secuencia sentido de ARNip (5'a 3')
25	5'-CGGCACAATCTTTCTGTTCAA -3'

Los ARNhc adecuados incluyen aquellos que tienen una identidad de secuencia superior al 80%, p. ej., 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 a 25, siempre y cuando tengan propiedades de unión similares o mejoradas y la actividad de silenciamiento de CIP2A como el ARNhc de referencia.

El silenciamiento de CIP2A también se puede obtener mediante terapia antisentido, donde los oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenarios sintéticos relativamente cortos (típicamente 13-25 nucleótidos) inactivan el gen CIP2A uniéndose a un ARNm correspondiente. Los oligonucleótidos antisentido pueden estar no modificados o modificados químicamente. En algunas realizaciones, el hidrógeno en la posición 2' de la ribosa se reemplaza por un grupo O-alquilo, tal como metilo. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos antisentido pueden contener uno o más análogos de nucleótidos sintéticos o naturales que incluyen, pero no se limitan a, PNA.

Además, el silenciamiento de CIP2A se puede obtener mediante ribozimas que escinden el ARNm de CIP2A. La tecnología de la ribozima se describe, por ejemplo, por Li et al. (Li et al., 2007).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "silenciamiento de CIP2A" se refiere a la reducción completa o parcial de la expresión del gen CIP2A. En algunas realizaciones, la expresión del gen CIP2A se reduce en al menos 50%, o al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% cuando se introduce el ARNhc específico de CIP2A, el precursor de miARN artificial, el ARNhc, el oligonucleótido antisentido, la ribozima o cualquier combinación de los mismos en un sujeto humano o animal.

En algunas realizaciones, el silenciamiento de CIP2A se puede obtener bloqueando o inhibiendo la interacción entre CIP2A y PP2A, especialmente la subunidad c de PP2A, que evita así la actividad de CIP2A hacia PP2Ac al menos 50%, o al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. Tales agentes bloqueantes o inhibidores incluyen, pero no se limitan a, péptidos y péptidos parciales modificados o no modificados producidos por recombinación o químicamente, así como moléculas no peptídicas, tales como compuestos químicos de molécula pequeña. Los métodos para identificar tales agentes se han descrito, p. ej. en el documento WO 2009/100173 y en el documento de EE.UU. 2009/239244.

Los compuestos químicos adecuados para su uso en diversas realizaciones de la presente invención incluyen los enumerados en la Tabla 3 y cualquiera de los estereoisómeros, sales o solvatos de los mismos.

Tabla 3. Compuestos químicos

Clase de fármaco	Fármaco de quimioterapia	Sinónimo	Fórmula molecular
Moléculas pequeñas inhibidoras de la tirosina quinasa	Lapatinib	INN, Tycerb [®]	C ₂₉ H ₂₆ ClFN ₄ O ₄ S
	Tandutinib		C ₃₁ H ₄₂ N ₆ O ₄
	Vandetanib	rINN, ZD6474, Zactima	C ₂₂ H ₂₄ BrFN ₄ O ₂
	Dasatinib	BMS 354825, Sprycel	C ₂₂ H ₂₆ ClN ₇ O ₂ S
	PKC-412	Midostaurina	C ₃₅ H ₃₀ N ₄ O ₄
		Benzoilestaurosporina	
	H-7		C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₂ S 2HCL
	Sunitinib	SU11248	C ₂₂ H ₂₇ FN ₄ O ₂
	Inhibidores de PARP		
	ABT-888	Velparib	C ₁₃ H ₁₆ N ₄ O 2HCl
Inhibidores de CHK1	AG-014699		C ₁₉ H ₁₈ FN ₃ O H ₃ PO ₄
	IND-71677	BSI-201, Iniparib, NSC 746045	C ₇ H ₅ N ₂ O ₃
	Olaparib		C ₂₄ H ₂₃ FN ₄ O ₃
	Inhibidor III de PARP (DPQ)	3-4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxil]-1(2H)-isoquinolina	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₂
	Inhibidores de CHK1		
	UCN-01	7-hidroxiestaurosporina	C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₄

Clase de fármaco	Fármaco de quimioterapia	Sinónimo	Fórmula molecular
	AZD7762	5-(3-Fluorofenil)-3-ureidotiofeno-N-[(S)piperidin-3-il]-2-carboxamida	$C_{17}H_{20}ClFN_4O_2S$
	PF-477736	PF-0044736	$C_{22}H_{25}N_7O_2$
	SB 218078		$C_{24}H_{15}N_3O_3$
	G66 976	PD 406976, GO 6976	$C_{24}H_{18}N_4O$
Glucosinolatos			
	Indol-3-carbinol	I3C	C_9H_9NO
Agentes alquilantes			
	Cisplatino	CDDP, Platino [®]	$Cl_2H_6N_2Pt$
	Temozolamida	TMZ, Temodal [®] , Temodar	$C_6H_6N_6O_2$
Alcaloides vegetales			
	Paclitaxel	Taxol [®] , Onxal TM	$C_{47}H_{51}NO_{14}$
	Vinorelbine	Vinorelbine tartrato Navelvine [®]	$C_{45}H_{54}N_4O_8$
Inhibidores de PI3K (p110 /)mTOR			
	Rapamicina	RAPA, Rapamune, Sirolimus, RPM, AY-22989	$C_{51}H_{79}NO_{13}$
	TGX-221		$C_{21}H_{24}N_4O_2$
Inhibidores de Histona Deacetilasa y ADN-PK			
	UN-7441	KU57788	$C_{25}H_{19}NO_3S$
	Tricostatina A	TSA	$C_{17}H_{22}N_2O_3$
Inhibidores de STAT			
	S31-201	NSC 74859	$C_{16}H_{15}NO_7S$
Antimetabolitos			
	Gemcitabina	Gemzar [®]	$C_9H_{11}F_2N_3O_4HCl$
Inhibidores restantes			
	LY2181308		
	Terameprecol		
	YM155		

5 Cualquiera de los compuestos descritos se puede convertir en una sal farmacéuticamente aceptable. La sal farmacéuticamente aceptable no está particularmente limitada siempre y cuando no sea tóxica. Ejemplos no limitativos de sales con una base inorgánica u orgánica incluyen sales de metales alcalinos (p. ej. sal de sodio, sal de potasio y similares), sales de metales alcalinotérreos (p. ej. sal de calcio, sal de magnesio y similares), sales de amonio, sales de amina (p. ej. sal de trietilamina) y similares. Ejemplos no limitativos de sales de adición de ácido derivadas de ácido mineral (p. ej. ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y similares) y sales derivadas de ácidos orgánicos (p. ej. ácido tartárico, ácido acético, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido succínico y similares).

La administración de ARNbc de CIP2A y compuestos de fórmula (I) puede ser concomitante, simultánea o posterior.

15 La administración de ARNbc específicos de CIP2A se puede realizar de dos maneras diferentes principalmente: 1) transcripción endógena de una secuencia de ácido nucleico que codifica el oligonucleótido, donde la secuencia de ácido nucleico se localiza en una construcción de expresión o 2) administración exógena del oligonucleótido.

20 Para la transcripción endógena, los ARNbc específicos de CIP2A se pueden insertar en sistemas de expresión adecuados que utilizan métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales sistemas de expresión incluyen vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores lentivirales, otros vectores virales, casetes de expresión y plásmidos, tales como los encapsulados en inmunoliposomas pegilados (PIL), con o sin uno o más promotores inducibles conocidos en la técnica. Ambas cadenas de ARNbc se pueden expresar en una construcción de expresión única a partir de promotores iguales o separados, o las cadenas se pueden expresar en construcciones de expresión separadas.

Los sistemas de expresión mencionados anteriormente también se pueden utilizar para la administración de precursores de miARN artificiales silenciadores de CIP2A y de ARNhc.

Típicamente, las construcciones de expresión se formulan en composiciones farmacéuticas antes de la administración a un sujeto humano o animal (p. ej. un sujeto canino). La administración se puede realizar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye la administración sistémica y local. La formulación depende de la ruta de administración prevista, como es conocido por una persona experta en la técnica. A modo de ejemplo, la construcción de expresión se puede administrar en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, o se puede embeber en una composición de liberación lenta adecuada. En algunos casos, la composición farmacéutica puede contener una o más células que producen la construcción de expresión. También se pueden utilizar bacterias para la administración de iARN. Por ejemplo, *Escherichia coli* de ingeniería recombinante puede entrar en células de mamífero después de la administración *in vivo* y transferir ARNhc. Un enfoque relacionado es utilizar minicélulas derivadas, p.ej. de *Salmonella enterica*.

Para la administración exógena, las moléculas de ARNbc se complejan típicamente con liposomas o portadores basados en lípidos, conjugados de colesterol o polietilenimina (PEI). Un nuevo enfoque prometedor es formar complejos de ARNbc con partículas estables de lípidos y ácidos nucleicos (SNALP). Las vías de administración adecuadas para la administración exógena, con o sin dicho complejo, incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (p. ej. inyección intravenosa), administración enteral (p. ej. por vía oral), administración local, administración tópica (p. ej. por vía dérmica o transdérmica) como es conocido por un experto en la técnica. Dado que la extirpación quirúrgica de un tumor suele ser la intervención clínica primaria, los ARNbc se pueden administrar directamente a la cavidad del tumor extirpado.

Los agentes quimioterapéuticos de fórmula (I) se pueden administrar a un sujeto humano o animal mediante cualquier vía adecuada conocida en la técnica que incluye, pero no se limita a, los enumerados para la administración de ARNbc específicos de CIP2A.

En la presente terapia de combinación, las moléculas de ARNbc y los compuestos de fórmula (I) se pueden formular en la misma composición farmacéutica o en una separada. Cuando se utilizan composiciones farmacéuticas separadas, la administración puede ser concomitante, simultánea o posterior. La formulación y/o vía de administración para las moléculas de ARNbc y los compuestos de fórmula (I) se pueden seleccionar independientemente entre sí. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender uno o más ARNbc silenciadores de CIP2A diferentes y/o uno o más agentes quimioterapéuticos de fórmula (I).

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en cualquier vehículo farmacológico apropiado adecuado para la administración. Se pueden administrar en cualquier forma que produzca efecto profiláctico, paliativo, preventivo o que cure enfermedades hiperproliferativas tales como el cáncer, en pacientes humanos o animales.

Para los propósitos de administración parenteral o tópica, los ARNbc y/o los compuestos de fórmula (I) se pueden formular, por ejemplo, como soluciones, suspensiones o emulsiones. Las formulaciones pueden comprender disolventes acuosos o no acuosos, codisolventes, solubilizantes, agentes dispersantes o humectantes, agentes suspensores y/o agentes de viscosidad, según sea necesario. Los ejemplos no limitantes de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua, soluciones hidroalcohólicas, que incluyen vehículos parenterales intermedios salinos y tamponados que incluyen solución de cloruro de sodio, la solución de dextrosa de Ringer, solución de dextrosa más cloruro de sodio, la solución de Ringer que contiene lactosa o aceites fijados. Los ejemplos no limitantes de vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos, tales como los basados en la dextrosa de Ringer y similares. Las composiciones acuosas pueden comprender agentes tampón adecuados, tales como tampones de fosfatos de sodio y potasio, citrato, acetato, carbonato o glicina que depende del intervalo de pH diana. El uso de cloruro de sodio como regulador de tonicidad también es útil. Las composiciones también pueden incluir otros excipientes, tales como agentes estabilizantes o conservantes. Los excipientes estabilizantes útiles incluyen tensioactivos (polisorbato 20 y 80, poloxámero 407), polímeros (polietilenglicoles, povidonas), carbohidratos (sacarosa, manitol, glucosa, lactosa), alcoholes (sorbitol, glicerol, propilenglicol, etilenglicol), proteínas adecuadas (albúmina), aminoácidos adecuados (glicina, ácido glutámico), ácidos grasos (etanolamina), antioxidantes (ácido ascórbico, cisteína, etc.), agentes quelantes (sales de EDTA, histidina, ácido aspártico) o iones metálicos (Ca, Ni, Mg, Mn).

Entre los agentes conservantes útiles están alcohol bencílico, clorbutanol, cloruro de benzalconio y posiblemente parabenos.

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, pastillas, polvos y gránulos. En tales formas farmacéuticas sólidas, los ARNbc y/o los compuestos de fórmula (I) se pueden mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas farmacéuticas también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias farmacéuticas adyuvantes, p. ej. agentes lubricantes de estearato o agentes aromatizantes. Las preparaciones orales sólidas también se pueden preparar con recubrimientos entéricos u otros que modulen la liberación de los principios activos.

Ejemplos no limitativos de formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes no tóxicos inertes

comúnmente utilizados en la técnica, tales como agua y alcohol. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, tampones, agentes emulsionantes, suspensores, edulcorantes y aromatizantes.

5 La composición farmacéutica se puede proporcionar en una forma concentrada o en forma de un polvo que se reconstituye según demanda. En el caso de la liofilización, se prefieren ciertos crioprotectores, que incluyen polímeros (povidonas, polietilenglicol, dextrano), azúcares (sacarosa, glucosa, lactosa), aminoácidos (glicina, arginina, ácido glutámico) y albúmina. Si se añade solución para la reconstitución al envase, puede consistir, por ejemplo, en agua estéril para inyección o solución de cloruro sódico o soluciones de dextrosa o glucosa.

10 Los medios y métodos para formular las presentes preparaciones farmacéuticas son conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden fabricar de una manera que se conoce en sí misma, por ejemplo, por medio de mezcla convencional, granulación, disolución, liofilización o procesos similares.

15 La presente terapia de combinación se puede utilizar para tratar enfermedades hiperproliferativas de humanos o animales que incluyen, pero no se limitan a, psoriasis, hipertrofia miocárdica, tumores benignos tales como adenoma, hamartoma y condroma, así como cánceres tales como carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cánceres cerebrales (p. ej. gliomas, astrocitomas y glioblastomas) y cánceres hematológicos (p. ej. leucemias y linfomas de células T y células B crónicos y agudos).

20 Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere no solo a la curación completa de una enfermedad, sino también a la prevención, alivio y mejora de una enfermedad o síntomas relacionados con la misma.

25 Por una "cantidad eficiente" de una combinación de ARNdc y compuestos de fórmula (I) se entiende una cantidad en la que los efectos dañinos de un tumor son, como mínimo, mejorados. Las cantidades y los regímenes para la administración de la presente terapia de combinación se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica clínica para el tratamiento de los trastornos relacionados con el cáncer. Generalmente, la dosificación de la presente terapia de combinación depende de consideraciones tales como: edad, sexo y salud general del paciente a tratar; tipo de tratamiento concurrente, si lo hay; frecuencia de tratamiento y naturaleza del efecto deseado; grado de daño tisular; duración de los síntomas; y otras variables a ser ajustadas por el médico individual. Se puede administrar una dosis deseada en una o más aplicaciones para obtener los resultados deseados. Las composiciones farmacéuticas según las presentes realizaciones se pueden proporcionar en formas de dosificación unitaria.

30 En una realización, los ARNbc se pueden administrar en una cantidad efectiva dentro del intervalo de dosificación de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o aproximadamente 1,0 µg/kg a aproximadamente 10 µg/kg. Los ARNbc se pueden administrar en una única dosis diaria, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas, p. ej. de dos, tres o cuatro veces al día. En una realización, los compuestos de fórmula (I) se pueden administrar en una cantidad eficaz dentro del intervalo de dosificación de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, o de aproximadamente 1,0 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Los compuestos de fórmula (I) se pueden administrar en una sola dosis diaria, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas, p. ej. de dos, tres o cuatro veces al día. El esquema de dosificación se puede seleccionar independientemente del esquema de dosificación de ARNbc.

40 Será obvio para una persona experta en la técnica que, a medida que avanza la tecnología, el concepto inventivo se puede implementar de varias maneras. La invención y sus realizaciones pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1. La inhibición de CIP2A sensibiliza las células T98G a varios fármacos de quimioterapia

45 Las células de cáncer de glioma derivadas de humanos, T98G que expresan p53 mutante, se transfectaron o con ARNip de SCR (25 nM) o con ARNip de CIP2A (Seq ID # 2; 25 nM). Después de 48 h, el medio que contenían ARNip se reemplazó por un medio que contenía un fármaco de quimioterapia a las concentraciones que se muestran en la Figura 1. Para determinar si la combinación de la inhibición de CIP2A con fármacos de quimioterapia estándar induciría una apoptosis más potente en comparación con las células tratadas o con ARNsi de SCR o con fármacos de quimioterapia solo, la actividad de Caspasa 3/7 (Caspase 3/7 glo assay, Promega) que se utiliza para determinar la inducción de apoptosis en las células, se midió 48 h más tarde según las instrucciones del fabricante.

50 Los resultados que se muestran en la Figura 1, demuestran que el ARNip de CIP2A solo no induce la apoptosis. Sin embargo, la combinación de ARNip de CIP2A con Lapatinib, Sunitinib; H-7; Vandetanib; Cisplatino; Paclitaxol; Temozolomida; Tandutinib o Indol-3-carbinol, claramente mejoraron la inducción de la apoptosis en las células T98G en comparación con las células tratadas solo con ARNip de CIP2A.

55 Ejemplo 2. La inhibición de CIP2A sensibiliza las células HeLa a varios fármacos de quimioterapia

Las células de cáncer de cuello uterino derivadas de humanos, HeLa en las que la función de p53 wt está debilitada por HPV 18 E6, se transfectaron o con ARNip de SCR (25 nM) o con ARNip de CIP2A (Seq ID # 6; 25 nM). Después de 72 h, el medio que contenía ARNip se reemplazó por un medio que contenía un fármaco de quimioterapia a

concentraciones que se muestran en la Figura 2. Para determinar si la combinación de la inhibición de CIP2A con fármacos de quimioterapia estándar reduciría la viabilidad celular más potentemente en comparación con células tratadas o con ARNip de SCR o con medicamentos de quimioterapia solo, se utilizó el ensayo CTG (Promega) 48 h más tarde, según las instrucciones del fabricante. Los resultados que se muestran en la Figura 2, demuestran que el ARNip de CIP2A solo no tiene efecto sobre la reducción de la viabilidad celular. Sin embargo, la combinación de ARNip de CIP2A con Laptaleib, PARPi (DPQ); Indol-3-carbinol; NU-7441; Rapamicina; S31-201; TGX-221; Tricostatina A; Gemcitabina; o PKC-412 redujo potencialmente más la viabilidad celular en comparación con las células tratadas solo con ARNip de CIP2A, que indica que la inhibición de CIP2A sensibilizó las células HeLa a estos fármacos quimioterapéuticos.

Ejemplo 3. Células tumorales de linfoma primario derivadas de ratones deficientes en CIP2A (CIP2A^{-/-}) que están sensibilizadas a fármacos de quimioterapia.

Las líneas celulares tumorales de linfoma primario de ratón que expresan p53 mutante, se derivaron del bazo de ratones con CIP2A de tipo salvaje (CIP2A^{+/+}) o deficientes en CIP2A (CIP2A^{-/-}) cruzados con la cepa de ratón Emu-myc. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se dejaron sedimentar durante 24 horas antes de que el medio de "crecimiento normal" se reemplazara por un medio que contenía fármaco de quimioterapia a las concentraciones que se muestran en la Figura 3. Para determinar si las células cancerosas deficientes en CIP2A se sensibilizaron a los fármacos de quimioterapia en comparación con las células cancerosas que expresan CIP2A, se midió la actividad de Caspasa 3/7 (caspasa 3/7 glo, Promega) que se utiliza para determinar la inducción de la apoptosis en las células 48 h más tarde según las instrucciones del fabricante. Los resultados que se muestran en la Figura 3, demuestran que la apoptosis se induce de manera más potente en células de linfoma que expresan niveles extremadamente bajos de CIP2A (CIP2A^{-/-}) cuando se tratan con diversos fármacos de quimioterapia, que incluyen: Lapatinib; PARPi (DPQ); PKC-412; Tandutinib; Temozolomida; Paclitaxol; NU-7441; TGX-221 o S31-201 en comparación con las células que expresan CIP2A.

Ejemplo 4. Las células tumorales de linfoma primario derivadas de ratones deficientes en CIP2A (CIP2A^{-/-}) están sensibilizadas a fármacos de quimioterapia, que da como resultado una viabilidad celular reducida.

Las líneas celulares tumorales de linfoma primario de ratón que expresan p53 mutante, se derivaron del bazo de ratones con CIP2A de tipo salvaje (CIP2A^{+/+}) o deficientes en CIP2A (CIP2A^{-/-}) cruzados con la cepa de ratón Emu-myc. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se dejaron sedimentar durante 24 horas antes de que el medio de "crecimiento normal" se reemplazara con un medio que contenía fármaco de quimioterapia a las concentraciones que se muestran en la Figura 4. Para determinar si el tratamiento de células deficientes en CIP2A con fármacos de quimioterapia reduciría la viabilidad celular en comparación con las células que expresan CIP2A, se realizó el ensayo de CTG (Promega) 48 h más tarde según las instrucciones del fabricante. Los resultados que se mostraron en la Figura 4, demuestran que la viabilidad celular se reduce de forma más potente en células de linfoma que expresan niveles de CIP2A extremadamente bajos (CIP2A^{-/-}) tratadas con diversos fármacos de quimioterapia que incluyen: Lapatinib; PARPi (DPQ); H-7; Tandutinib; PKC-312; Rapamicina; Tricostatina A; S31-201 o TGX-221 en comparación con células que expresan CIP2A.

Ejemplo 5. La inhibición de CIP2A sensibiliza las células MKN28 a varios fármacos quimioterapéuticos

Las células de cáncer gástrico derivadas de humano, MKN28, que expresan p53 mutante, se transfectaron o con ARNip de SCR (25 nM) o con ARNip de CIP2A (SEC ID # 6; 25 nM). Después de 48 h, el medio que contenía ARNip se reemplazó por un medio que contenía un fármaco de quimioterapia a las concentraciones que se muestran en la Figura 5. Para determinar si la combinación de la inhibición de CIP2A con fármacos de quimioterapia estándar induciría la apoptosis de forma más potente en comparación con células tratadas o con ARNip de SCR o con fármacos de quimioterapia solo, se midió la actividad de Caspasa 3/7 (Caspase 3/7 glo assay, Promega) que se utiliza para determinar la inducción de apoptosis en las células, 48 h más tarde según las instrucciones del fabricante. Los resultados que se muestran en la Figura 5, demuestran que el ARNip de CIP2A solo indujo la apoptosis en comparación con las células MKN28 tratadas solo con ARNip de SCR. Sin embargo, el nivel de apoptosis se mejora claramente cuando se combina ARNip de CIP2A con varios fármacos de quimioterapia que incluyen: H-7, Vandetanib, Cisplatino, Paclitaxol, Temozolomida, Gemcitabina, PKC-412, Indol-3-carbinol y Tandutinib.

Ejemplo 6. La inhibición de CIP2A no sensibiliza las células MCF-7, que expresan p53 de tipo salvaje, a fármacos quimioterapéuticos.

Las células de cáncer de mama derivadas de humanos, MCF-7, que expresan p53 de tipo salvaje, se transfectaron o con ARNip de SCR (25 nM) o con ARNip de CIP2A (Sec. ID # 2; 25 nM). Después de 48 h, el medio que contenía ARNip se reemplazó por un medio que contenía un fármaco de quimioterapia a las concentraciones que se muestran en la Figura 6. Para determinar si la combinación de inhibición de CIP2A con fármacos de quimioterapia estándar induciría la apoptosis de forma significativa en comparación con células tratadas o con ARNip de SCR o con fármacos de quimioterapia solo, se midió la actividad de Caspasa 3/7 (Caspase 3/7 glo assay, Promega), que se utiliza para determinar la inducción de apoptosis en las células, 48 h más tarde según las instrucciones del fabricante. Los resultados que se muestran en la Figura 6, demuestran que el ARNip de CIP2A solo no indujo la

apoptosis en comparación con las células MCF-7 tratadas solo con ARNip de SCR. Del mismo modo, la combinación de ARNip de CIP2A con diversos fármacos quimioterapéuticos no indujo apoptosis en estas células que expresan p53 de tipo salvaje.

5 Bibliografía

- Chari, N.S., N.L. Pinaire, L. Thorpe, L.J. Medeiros, M.J. Routbort, and T.J. McDonnell. 2009. The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death. *Apoptosis*. 14:336-47.
- Cui, W., J. Ning, U.P. Naik, and M.K. Duncan. 2004. OptilARN, an IARN design tool. *Comput Methods Programs Biomed*. 75:67-73.
- 10 Junttila, M.R., P. Puustinen, M. Niemela, R. Ahola, H. Arnold, T. Bottzauw, R. Ala-Aho, C. Nielsen, J. Ivaska, Y. Taya, S.L. Lu, S. Lin, E.K. Chan, X.J. Wang, R. Grenman, J. Kast, T. Kallunki, R. Sears, V.M. Kahari, and J. Westermarck. 2007. CIP2A Inhibits PP2A in Human Malignancies. *Cell*. 130:51-62.
- 15 Khanna, A., C. Bockelman, A. Hemmes, M.R. Junttila, J.P. Wiksten, M. Lundin, S. Junnila, D.J. Murphy, G.I. Evan, C. Haglund, J. Westermarck, and A. Ristimaki. 2009. MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst*. 101:793-805.
- Kim, D.H., M.A. Behlke, S.D. Rose, M.S. Chang, S. Choi, and J.J. Rossi. 2005. Synthetic ARNbc Dicer substrates enhance IARN potency and efficacy. *Nat Biotechnol*. 23:222-6.
- Li, Q.X., P. Tan, N. Ke, and F. Wong-Staal. 2007. Ribozyme technology for cancer gene target identification and validation. *Adv Cancer Res*. 96:103-43.
- 20 Silva, J.M., M.Z. Li, K. Chang, W. Ge, M.C. Golding, R.J. Rickies, D. Siolas, G. Hu, P.J. Paddison, M.R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Bur- chard, A. KulkiARN, G. Cavet, R. Sachidanandam, W.R. McCombie, M.A. Cleary, S.J. Elledge, and G.J. Hannon. 2005. Second-generation ARNhc libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet*. 37:1281-8.
- 25 Vassilev, L.T., B.T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, and E.A. Liu. 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 303:844-8.
- Westermarck, J., and W.C. Hahn. 2008. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 14:152-60.
- 30 Zhao, J.J., T.M. Roberts, and W.C. Hahn. 2004. Functional genetics and experimental models of human cancer. *Trends Mol Med*. 10:344-50.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Turun yliopisto	
	<120> Terapia de combinación	
	<130> 2110986PC	
10	<160> 25	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> molécula ARNip	
	<400> 1	
	aacataagtg cttcactgat ctt	23
25	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> molécula ARNip	
	<400> 2	
	aactgtgggt gtgtttgcac ttt	23
35	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> molécula ARNip	
	<400> 3	
45	gguugcagau ucugaauuat t	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> molécula ARNip	
55	<400> 4	
	aaugccuugu cuaggauuat t	21
	<210> 5	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> molécula ARNip	
65	<400> 5	

accauugaua uccuuagaat t 21

5 <210> 6
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 6
gatagcaatg atccacagtt taagtgggtg 29

15 <210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 7
cttgtcggc acaatcttct tgttcaaac 29

25 <210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 8
gtacttgag aaagtatagc agcaaaca 29

35 <210> 9
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

45 <400> 9
cagttgacct actgatgat ctccttaag 29

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

55 <400> 10
cgcagattct gaattatgca aa 22

<210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

65 <400> 11

agcacataaa gacattgagt aa 22

5 <210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 12
attcctgata gatcacattc aa 22

15 <210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 13
cacgtcagat aatagagaac aa 22

25 <210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 14
35 catggatgta tatgaaatga aa 22Ç

<210> 15
<211> 22
<212> ADN
40 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

45 <400> 15
ccggcacaat ctttctgttc aa 22

<210> 16
<211> 22
50 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

55 <400> 16
agcacataaa gacattgagt aa 22

<210> 17
60 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
65 <223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 17

cgcaaacttg ctgctgatgt aa 22

5 <210> 18
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 18
ccggcacaat ctttctgttc aa 22

15 <210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

25 <400> 19
cgcagcaagt tgaatcagaa a 21

30 <210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 20
ccacagttta agtgggtgaa a 21

40 <210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 21
gctagtatgt tgagagaagt t 21

50 <210> 22
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 22
gctagtagac agagaacata a 21

60 <210> 23
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 23

ES 2 650 742 T3

gacagaaact cacacgacta t 21

5 <210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 24
ccacagttta agtgggtggaa a 21

15 <210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia sentido ARNhc

<400> 25
cggcacaatc tttctgttca a 21

25

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de al menos un tipo de un agente silenciador de CIP2A seleccionado del grupo que consiste en una molécula de ARNip, una molécula de ARNipD, un precursor de miARN artificial, una molécula de ARNhc, un oligonucleótido antisentido y una ribozima; y al menos un tipo de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en PKC-412, inhibidor III de PARP, indol-3-carbinol, cisplatino, rapamicina, TGX-221, NU-7441, S31-201 y gemcitabina, para su uso como medicamento en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo que comprende células con la función de p53 alterada.
2. La combinación para su uso según la reivindicación 1, en donde el agente silenciador de CIP2A comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 25, y secuencias que tienen al menos 80% de identidad de secuencia con dicha SEQ ID NO: 1 a 25 y que conserva su actividad silenciadora de CIP2A.
3. La combinación para su uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad hiperproliferativa se selecciona de un grupo que consiste en psoriasis, hipertrofia miocárdica, tumores benignos, cánceres sólidos y cánceres hematológicos.
4. La combinación para su uso según la reivindicación 3, en donde dicho cáncer sólido se selecciona de un grupo que consiste en carcinomas de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, glioma, astrocitoma y glioblastoma y cánceres hematológicos se seleccionan de un grupo que consiste en leucemias y linfomas de células T y células B agudos y crónicos.
5. Una composición farmacéutica que comprende una combinación definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Un agente silenciador de CIP2A seleccionado del grupo que consiste en una molécula de ARNip, una molécula de ARNipD, un precursor de miARN artificial, una molécula de ARNhc, un oligonucleótido antisentido y una ribozima para su uso en la sensibilización de células hiperproliferativas con la función de p53 deteriorada con un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en PKC-412, inhibidor III de PARP, indol-3-carbinol, cisplatino, rapamicina, TGX-221, NU-7441, S31-201, y gemcitabina en un sujeto humano o animal que necesita dicha sensibilización para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.
7. Un método para determinar la sensibilidad a una terapia contra el cáncer en un sujeto que necesita tal terapia, en donde el método comprende:

evaluar la expresión y/o actividad de la proteína de CIP2A y p53 en una muestra obtenida de dicho sujeto, y

determinar si un sujeto cuya muestra es negativa para la expresión y/o actividad de CIP2A y con la actividad de p53 deteriorada es sensible a la monoterapia contra el cáncer por al menos un agente quimioterapéutico, y

determinar si un sujeto cuya muestra es positiva para la expresión de CIP2A y con la actividad de p53 deteriorada es sensible a la combinación según la reivindicación 1 como terapia contra el cáncer.
8. El método según la reivindicación 7, en donde dicho sujeto padece una enfermedad definida en la reivindicación 3 o 4.
9. Un kit para la práctica del método según la reivindicación 7 que comprende reactivos para evaluar la expresión de CIP2A y p53 y/o la actividad de la proteína.

Figura 1

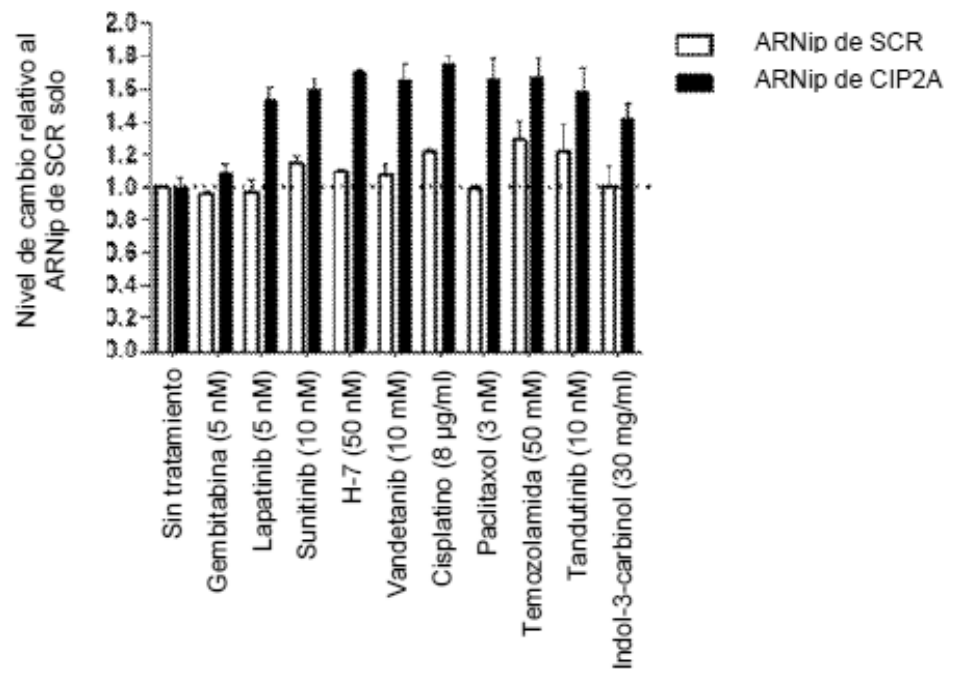


Figura 2

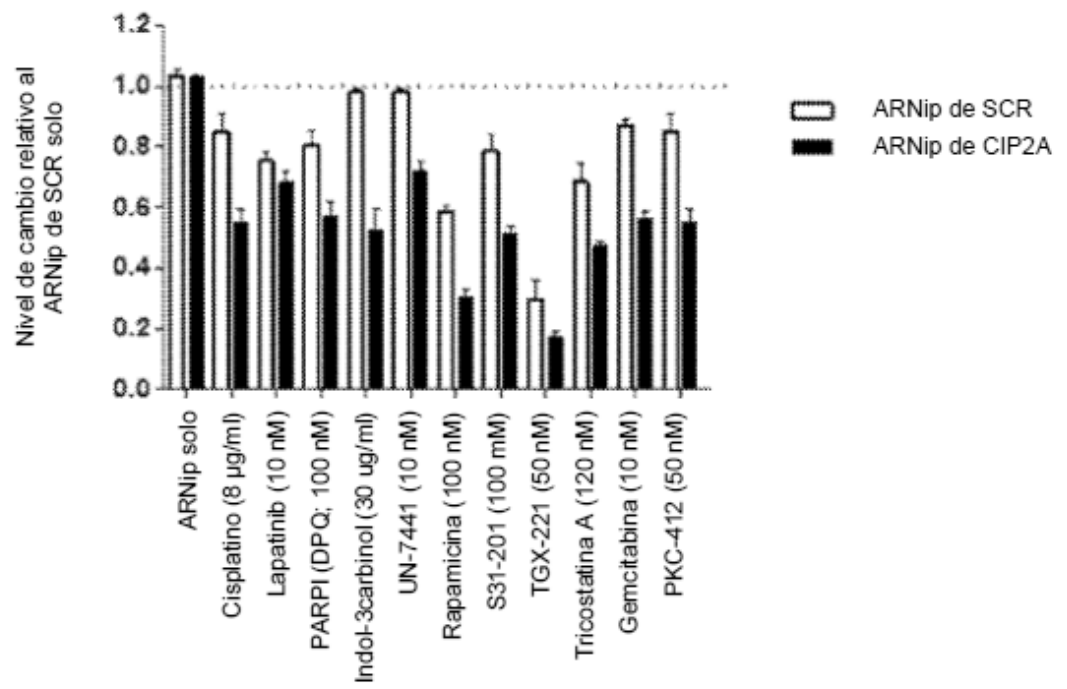


Figura 3

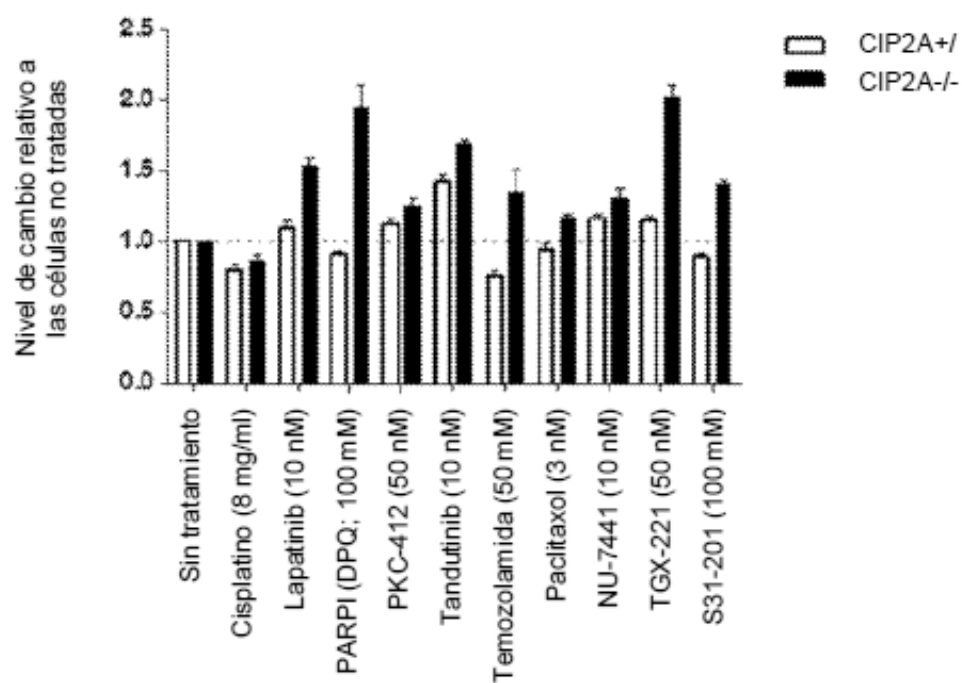


Figura 4

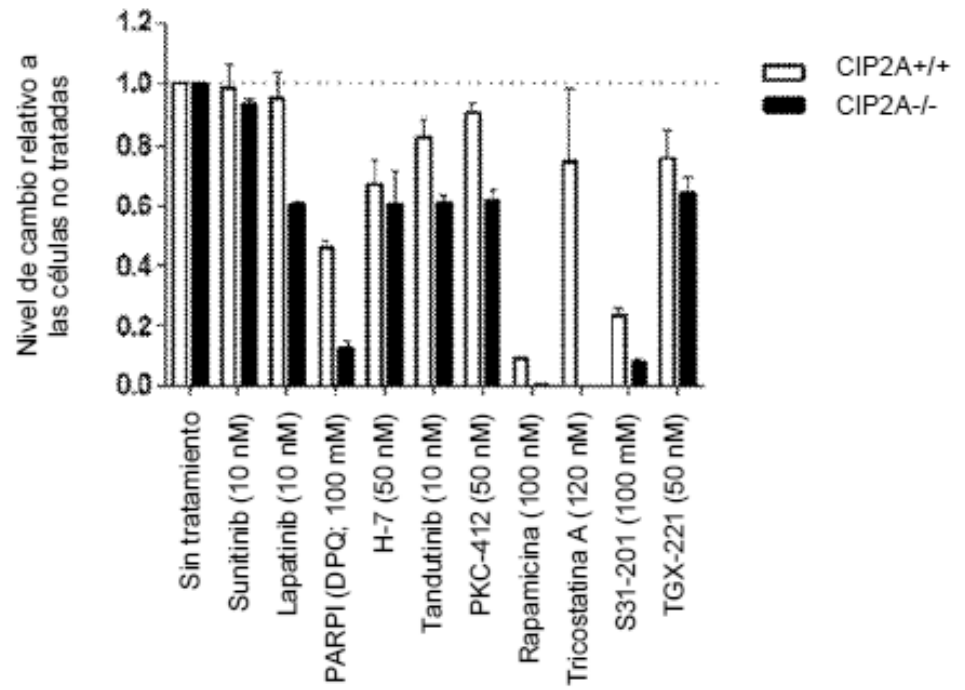


Figura 5

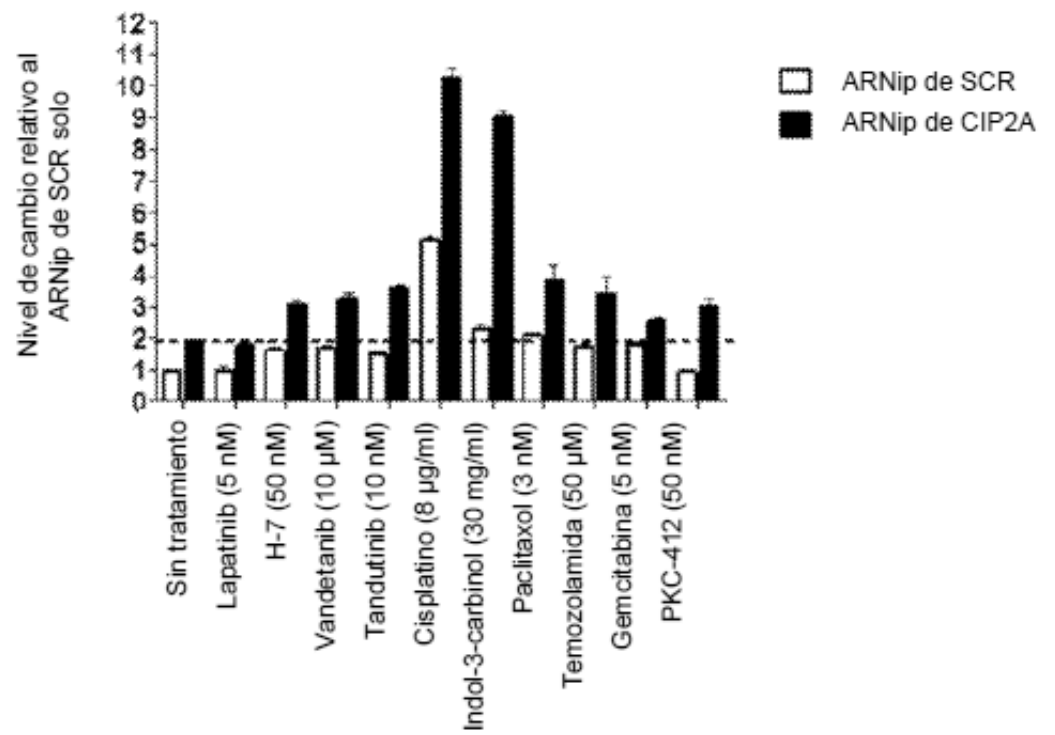


Figura 6

