

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 494**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127	(2006.01)	C12N 15/09	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01)	C12N 15/113	(2010.01)
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)
A61K 31/713	(2006.01)	C12N 15/11	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01)	A61K 47/50	(2007.01)
A61K 47/18	(2007.01)	A61K 47/69	(2007.01)
A61K 47/24	(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: **01.11.2013 PCT/JP2013/080367**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14178152**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2013 E 13883388 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2992874**

54 Título: **Liposoma para administración tópica y aplicación del mismo**

30 Prioridad:

30.04.2013 JP 2013095950

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

27.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ISHIDA, TATSUHIRO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 691 494 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

Liposoma para administración tópica y aplicación del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un liposoma para administración tópica y un agente antitumoral que usa tal liposoma.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los liposomas están formados por fosfolípidos que constituyen membranas celulares de organismos, tienen biocompatibilidad elevada, y pueden suministrar fármacos y principios activos a la vez que los protegen de enzimas de degradación *in vivo*. Por consiguiente, los liposomas han llamado la atención como herramientas útiles para sistemas de administración de fármaco. En los últimos años, se han desarrollado y generalmente se usan liposomas modificados con polietilenglicol (PEG) que mejoran la capacidad de retención en la sangre y liposomas que comprenden, como lípidos constitutivos, fosfatidilcolina hidrogenada libre de enlaces insaturados que mejora la estabilidad en la sangre y resistencia y colesteroles que elevan la temperatura de transición de fases de la membrana.

Por otro lado, las moléculas de ARNi que inducen ARN de interferencia (en lo sucesivo en el presente documento denominado "ARNi") han llamado la atención como herramientas útiles para tratamiento tumoral y otros fines, y se ha desarrollado una gran diversidad de moléculas de ARNi que son capaces de inhibición del crecimiento tumoral. Además, se ha desarrollado un método de uso de complejos formados por moléculas de ARNi y liposomas (es decir, lipoplejos) para suministrar moléculas de ARNi como principios activos a células tumorales (Qixin Leng *et al.*, Drug Future, septiembre de 2009; 34 (9): 721; Sherry Y., Wu *et al.*, The AAPS Journal, Vol. 11, N.º 4, diciembre de 2009; y B. Ozpolat *et al.*, Journal of Internal Medicine 267; 44-53, 2009).

En el pasado, los presentes inventores desarrollaron moléculas de ARNi que se dirigen a timidilato sintasas (en lo sucesivo en el presente documento denominadas "TS"), que está implicada en la síntesis del ADN (documento WO 2010/113844). Los inventores informaron que la administración de tales moléculas de ARNi a los tumores a través de administración intravenosa con el uso de liposomas modificados con PEG que contienen colesteroles a una concentración dada podría hacer posible inhibir el crecimiento de tumores que muestran expresión de TS. Los inventores también informaron que el uso de tales liposomas en combinación con agentes quimioterapéuticos podría dar como resultado mejora del tropismo tumoral así como la mejora de efectos antitumorales de moléculas de ARNi hasta un alcance significativo (documento WO 2012/161196).

Sin embargo, en la técnica se ha esperado el desarrollo de un medio que haga posible introducir de forma más eficaz moléculas de ARNi capaces de inhibición del crecimiento tumoral en células tumorales.

El documento US 2008/0306153 desvela conjuntos de lípidos, tales como liposomas, que comprenden lípidos que incorporan uno o más elementos potenciadores de la transfección (los TEE), que tienen la fórmula:
Resto lipídico-[Resto hidrófobo-resto hidrófilo sensible al pH].

El documento WO 98/45463 desvela liposomas que comprenden lípidos catiónicos, que incluyen DC-6-14.

Sumario de la Invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo sistema de administración que pueda administrar de forma eficaz un principio activo a una célula diana.

De forma más específica, un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo liposoma que permita una administración eficaz de una molécula de ARNi capaz de inhibición del crecimiento tumoral a una célula tumoral.

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados con el fin de alcanzar los objetivos mencionados anteriormente. Como resultado, descubrieron que la administración tópica a un liposoma que está formado por dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina, y lípido catiónico, que no se modifica con PEG, que está libre de colesteroles, y que comprende un principio activo soportado sobre el mismo a una región que incluye una célula diana o una zona en las proximidades de la misma podría permitir una administración eficaz de un principio activo a la célula diana. Esto ha conducido a la finalización de la presente invención.

De forma específica, la presente invención proporciona:

- liposomas para uso mediante administración tópica en un método de tratamiento médico, como se define en las reivindicaciones; y

- composiciones para uso mediante administración tópica en un método de tratamiento médico, como se define en las reivindicaciones;
- agentes antitumorales para uso mediante administración tópica en un método de tratamiento de tumor, como se define en las reivindicaciones; y
- 5 - productos combinados que comprenden los agentes antitumorales de la invención, como se define en las reivindicaciones.

La presente invención puede proporcionar un nuevo liposoma que permita la administración eficaz de un principio activo a una célula diana a través de administración tópica del mismo.

De forma específica, la presente invención puede proporcionar un nuevo liposoma que permita una administración eficaz de una molécula de ARNi capaz de inhibición del crecimiento tumoral a una célula tumoral a través de administración tópica de la misma.

15 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral de un agente quimioterapéutico para cáncer, ARNsh de TS, ARNsh de NS, y ARNsh en combinación con un agente quimioterapéutico para cáncer en células de mesotelioma pleural maligno humano. La Fig. 1 (A) muestra los resultados para ARNsh a una concentración final de 5 nM, y la Fig. 1 (B) muestra los resultados para ARNsh a una concentración final de 10 nM (***: $p < 0,005$).

La Fig. 2 muestra los efectos inhibitorios de expresión de TS de ARNsh de TS y ARNsh de NS en células de mesotelioma pleural maligno humano.

La Fig. 2 (A) muestra los resultados de transferencia puntal de Western, y la Fig. 2 (B) muestra los resultados de cuantificación del nivel de expresión de TS sobre la base de los resultados de transferencia puntal de Western. La proporción de TS/ β -actina se representa en forma de porcentaje con respecto a un 100 %, que se asigna a la muestra de control sin tratamiento con ARNsh.

La Fig. 3 muestra los resultados de una comparación de efectos de introducción de ARNsh de Luc con el uso de diversos liposomas catiónicos a través de ensayos de luciferasa doble.

La Fig. 4 muestra fotografías que demuestran los resultados de crecimiento tumoral en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno. El número de días indicado para cada fotografía representa el número de días después del implante de células de mesotelioma pleural maligno.

La Fig. 5-1 muestra fotografías que demuestran los resultados de una comparación de efectos de introducción de ARNsh de Luc con el uso de diversos liposomas catiónicos en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno. En la Fig. 5-1, (A) muestra los resultados para el control (sacarosa al 9 %); (B) muestra los resultados para un liposoma que contiene DEPC (DEPC); (C) muestra los resultados para un liposoma que contiene DMPC (DMPC); (D) muestra los resultados para un liposoma que contiene DOPC (DOPC); y (E) muestra los resultados para un liposoma que contiene POPC (POPC).

La Fig. 5-2 muestra los resultados de cuantificación de efectos de introducción de ARNsh de Luc con el uso de diversos liposomas catiónicos en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno sobre la base de los resultados que se muestran en la Fig. 5-1 (*: $p < 0,005$).

La Fig. 6-1 muestra fotografías que demuestran los resultados de una comparación de efectos de introducción de ARNsh de Luc con el uso de diversos liposomas catiónicos con diferentes contenidos de DC-6-14 en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno. En la Fig. 6-1, (A) muestra los resultados para un liposoma con contenido de DC-6-14 de un 20 %, (B) muestra los resultados para un liposoma con contenido de DC-6-14 de un 35 %, y (C) muestra los resultados para un liposoma con contenido de DC-6-14 de un 50 %, en moles.

La Fig. 6-2 muestra los resultados de cuantificación de efectos de introducción de ARNsh de Luc con el uso de diversos liposomas catiónicos con diferentes contenidos de DC-6-14 en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno sobre la base de los resultados que se muestran en la Fig. 6-1 (*: $p < 0,005$).

La Fig. 7-1 muestra fotografías que demuestran los resultados de una comparación de efectos de introducción de ARNsh de Luc con el uso de diversos liposomas catiónicos modificados con PEG y no modificados con PEG en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno. En la Fig. 7-1, (A) muestra POPC modificado con PEG; es decir, los resultados para un liposoma que contiene POPC modificado con PEG, (B) muestra POPC no modificado con PEG; es decir, los resultados para un liposoma que contiene POPC no modificado con PEG, (C) muestra DOPC modificado con PEG; es decir, los resultados para un liposoma que contiene DOPC modificado con PEG, y (D) muestra DOPC no modificado con PEG; es decir, los resultados para un liposoma que contiene DOPC no modificado con PEG.

La Fig. 7-2 muestra los resultados de cuantificación de efectos de introducción de ARNsh de Luc con el uso de diversos liposomas catiónicos en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno sobre la base de los resultados que se muestran en la Fig. 7-1 (**: $p < 0,01$).

La Fig. 8-1 muestra fotografías que demuestran los resultados de una comparación de efectos inhibitorios del crecimiento tumoral de un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa, un lipoplejo que comprende ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa, un agente quimioterapéutico

para cáncer (PMX), y un lipoplejo en combinación con un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX) en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno. En la Fig. 8-1, (A) muestra los resultados para el control (sacarosa al 9 %); (B) muestra ARNsh de NS; es decir, los resultados de tratamiento con un lipoplejo que comprende ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa solo; (C) muestra ARNsh de TS; es decir, los resultados de tratamiento con un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa solo; (D) muestra PMX; es decir, los resultados de tratamiento con un agente quimioterapéutico para cáncer solo; (E) muestra PMX + ARNsh de NS; es decir, los resultados de tratamiento con un agente quimioterapéutico para cáncer en combinación con un lipoplejo que comprende ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa; y (F) muestra PMX + ARNsh de TS; es decir, los resultados de tratamiento con un agente quimioterapéutico para cáncer en combinación con un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa.

La Fig. 8-2 muestra los resultados de cuantificación de efectos inhibitorios del crecimiento tumoral conseguidos con diversos tratamientos en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno sobre la base de los resultados que se muestran en la Fig. 8-1 (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,01$).

La Fig. 8-3 muestra las tasas de supervivencia (%) de modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno sometido a tratamiento con el control (sacarosa al 9 %), un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX) solo, un lipoplejo que comprende ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa solo, un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa solo, o un lipoplejo en combinación con un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX).

La Fig. 8-4 muestra el tiempo medio de supervivencia (MST) y el aumento de la esperanza de vida (ILS) de modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno sometidos a tratamiento con el control (sacarosa al 9 %), un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa solo, un lipoplejo que comprende ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa solo, un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX) solo, o un lipoplejo en combinación con un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX).

La Fig. 9 muestra los resultados de cuantificación de niveles de expresión de TS ARNm en células tumorales de modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno sometido a tratamiento con el control (sacarosa al 9 %), un lipoplejo que comprende ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa solo, un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa solo, un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX) solo, o un lipoplejo en combinación con un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX). Los niveles de expresión de TS ARNm se representan en forma de porcentaje con respecto a un 100 %, que se asigna al control (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

La Fig. 10 muestra los resultados de una comparación de efectos de introducción de ARNsh de Luc con el uso de diversos liposomas catiónicos y presomas catiónicos a través de ensayos de luciferasa doble.

La Fig. 11 muestra fotografías que demuestran los resultados de una comparación de los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral de un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa, un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa, un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX), y un lipoplejo o preplejo en combinación con un agente quimioterapéutico para cáncer (PMX) en células tumorales en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno. En la Fig. 11, (A) muestra los resultados para el control (sacarosa al 9 %); (B) muestra PMX; es decir, los resultados de tratamiento con un agente quimioterapéutico para cáncer solo; (C) muestra preplejo de TS; es decir, los resultados de tratamiento con un preplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa solo; (D) muestra PMX + preplejo de TS; es decir, los resultados de tratamiento con un agente quimioterapéutico para cáncer en combinación con un preplejo que comprende ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa; (E) muestra lipoplejo de TS; es decir, los resultados de tratamiento con un lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa solo; y (F) muestra PMX + lipoplejo de TS; es decir, los resultados de tratamiento con un agente quimioterapéutico para cáncer en combinación con un lipoplejo que comprende ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa.

La Fig. 12 muestra los resultados de mediciones de pesos corporales de modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno sometido a tratamiento con un agente quimioterapéutico para cáncer y/o un lipoplejo o preplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa.

Realizaciones para realizar la invención

1. Liposoma

El liposoma para uso de la presente invención está en forma un cuerpo hueco esférico que consiste en una bicapa lipídica que consiste en dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina, y lípido catiónico.

La "fosfatidilcolina" que se puede usar en la presente invención comprende al menos una cadena de ácido graso insaturado que contiene un doble enlace de carbono a carbono; y en algunas realizaciones, la fosfatidilcolina comprende al menos una cadena de ácido graso insaturados que contiene un doble enlace de carbono a carbono en forma cis. La fosfatidilcolina puede tener una temperatura de transición de fases baja (por ejemplo, inferior a 0 °C, inferior a -10 °C, o inferior a -20 °C).

Los ejemplos de tal "fosfatidilcolina" incluyen 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), palmitoil-oleoil

fosfatidilcolina (POPC), y 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), con DOPC siendo preferente.

El "lípidio catiónico" que se puede usar en la presente invención es DC-6-14.

5 El liposoma de la presente invención consiste preferentemente en DOPE, DOPC, y DC-6-14.

La proporción de DOPE, fosfatidilcolina (DOPC), y lípidio catiónico (DC-6-14) en el liposoma se puede determinar preferentemente en un intervalo de 2 a 4:1 a 3:4 a 6 en moles. La proporción de DOPE:DOPC:DC-6-14 es preferentemente 3:2:5.

10 El liposoma de la presente invención se puede preparar de acuerdo con una técnica convencional, tal como agitación de película fina (el método Bangham) (A. D. Bangham *et al.*, J. Mol. Biol., 13, 238-252, 1965; A. D. Bangham y R. W. Horne, J. Mol. Biol., 8, 660-668, 1964). De forma específica, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, y lípidio catiónico se disuelven por separado en un disolvente orgánico, tal como cloroformo, y se recogen y se mezclan en un recipiente tal como un matraz para conseguir la composición dada que se ha descrito anteriormente. A continuación, el disolvente orgánico se evapora para formar una capa lipídica en la parte inferior del recipiente, una solución acuosa tal como un tampón se introduce en el mismo, y la mezcla se agita para obtener una suspensión que contiene el liposoma. El "liposoma" en ocasiones se denomina "liposoma catiónico" en el presente documento, y estos términos se usan indistintamente.

20 Como alternativa, el liposoma de la presente invención se prepara por disolviendo por separado fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, y lípidio catiónico en un disolvente orgánico, tal como cloroformo, recogiendo los para conseguir la composición dada que se ha descrito anteriormente, añadiendo un disolvente orgánico (por ejemplo, ciclohexano en una cantidad de 5 a 30 veces, preferentemente de 5 a 15 veces, y más preferentemente 10 veces la cantidad de lípidio total en peso y un alcohol (preferentemente etanol) en una cantidad de un 1 % a un 10 %, preferentemente de un 1 % a un 5 %, y más preferentemente un 2 % de la cantidad de ciclohexano en peso), y calentando la mezcla de 50 °C a 80 °C, y preferentemente de 65 °C a 75 °C para preparar una solución. Posteriormente, la solución resultante se filtra, el disolvente orgánico se congela con el uso de hielo seco y acetona, el disolvente orgánico se retira mediante tratamiento de secado (se tritura, de acuerdo con la necesidad), y en la misma se introduce una solución acuosa tal como un tampón. Por lo tanto, se puede obtener una suspensión que contiene el liposoma. En ocasiones el liposoma obtenido de ese modo se denomina "presoma" o "presoma catiónico" en el presente documento. Un presoma se puede conservar en forma liofilizada.

35 Un tamaño de partícula del liposoma de la presente invención es de 80 nm a 200 nm, y preferentemente aproximadamente 100 nm. El potencial zeta del el liposoma de la presente invención es de 40 a 60 mV, y preferentemente aproximadamente 50 mV. Cuando el liposoma de la presente invención es el presoma, un tamaño de partícula del mismo es de 100 nm a 600 nm, y preferentemente de aproximadamente 100 nm a 200 nm.

40 El liposoma de la presente invención se puede usar como un vehículo para administración tópica de un principio activo. En la presente invención, la "administración tópica" tiene como objeto la administración de un principio activo directamente a una zona afectada, una lesión, y/o una zona en las proximidades de la misma, con el fin de permitir que el principio activo actúe en la zona o lesión afectadas. Por consiguiente en la presente invención, la "administración tópica" no se refiere a la administración sistémica de un principio activo mediante inyección intravenosa u otros medios. Los ejemplos de administración tópica incluyen, pero no se limitan a, inyecciones intramuscular, intraperitoneal, intratorácica, hipodérmica, endodérmica, intraocular, intracerebral, intratecal, intravaginal, intrarrectal, intraorgánica, e intratumoral y aplicación a la epidermis. La expresión "administración tópica" preferentemente se refiere a una administración intracavitaria, y más preferentemente administración intratorácica o intraperitoneal. La expresión "principio activo" se refiere a un principio activo de un producto farmacéutico o cosmético. Los ejemplos de los mismos incluyen ADN, ARN, un híbrido de ADN-ARN, una proteína, un péptido, y un compuesto.

2. Composición

55 La composición para uso de la presente invención comprende el liposoma para uso de la presente invención y el principio activo, y tal composición se puede usar para administración tópica del principio activo.

Los ejemplos de principios activos incluyen los que se han usado anteriormente a modo de ejemplo. Por ejemplo, los principios activos pueden ser ARNsi o ARNsh que es capaz de inhibir la expresión de genes que codifican factores expresados en células tumorales y que están implicados con el crecimiento de células tumorales a través de ARNi, aunque los principios activos no se limitan en particular a lo mismo. Los ejemplos de "genes que codifican factores expresados en células tumorales e implicados con el crecimiento de células tumorales" incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican factores reguladores del crecimiento, tales como timidilato sintasa, VEGF, EGFR, PDGF, HGF, Wint, Bcl-2, y survivina, y enzimas implicadas en la síntesis de ácidos nucleicos, tales como ribonucleótido reductasa y ADN polimerasa. La información genética sobre estos genes se desvela en bases de datos conocidas de GenBank y similares, y ARNsi o ARNsh se pueden designar y sintetizar basándose en la información genética de ese tipo. El ARNsh que se describe con detalle a continuación se puede usar como ARNsh que puede inhibir la

expresión de la timidilato sintasa a través del ARNi. Como alternativa, un agente anticáncer o agente quimioterapéutico para el cáncer se puede usar como un principio activo.

5 En la composición de la presente invención, un principio activo puede estar contenido en una parte hueca encerrada por una bicapa lipídica de un liposoma, o se puede unir a la superficie de la membrana externa de una bicapa lipídica. Un principio activo se une preferentemente a la superficie de la membrana externa de una bicapa lipídica de un liposoma.

10 La composición de la presente invención también puede contener, además del liposoma y el principio activo, un excipiente, un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un diluyente, un solubilizante, un agente de suspensión, un agente de isotonicidad, un regulador del pH, un tampón, un estabilizante, un colorante, un agente saborizante, un agente mejorador del olor, histidina, u otras sustancias que se usan generalmente en la producción de productos farmacéuticos o cosméticos.

15 Los ejemplos de excipientes incluyen lactosa, sacarosa, cloruro sódico, glucosa, maltosa, manitol, eritritol, xilitol, maltitol, inositol, dextrano, sorbitol, albúmina, urea, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa cristalina, ácido silícico, metilcelulosa, glicerina, alginato sódico, goma arábica, y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de lubricantes incluyen talco purificado, estearato, borato de sodio, polietilenglicol, y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de aglutinantes incluyen jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, alcohol polivinílico, polivinil éter, polivinil pirrolidona, carboximetilcelulosa, goma laca, metilcelulosa, etilcelulosa, agua, etanol, fosfato potásico, y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de agentes disgregantes incluyen almidón seco, alginato de sodio, agar en polvo, laminarano en polvo, bicarbonato sódico, carbonato de calcio, ésteres de ácido graso de polioxietileno y sorbitán, lauril sulfato sódico, monoglicérido de ácido esteárico, almidón, lactosa, y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de diluyentes incluyen agua, alcohol etílico, macrogol, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxilado, ésteres de ácido graso de polioxietileno y sorbitán, y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de estabilizantes incluyen piro-sulfito sódico, ácido etilendiamintetraacético, ácido tioglicónico, ácido tioláctico, y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de agentes de isotonicidad incluyen cloruro sódico, ácido bórico, glucosa, glicerina, y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de reguladores del pH y tampones incluyen citrato sódico, ácido cítrico, acetato sódico, fosfato sódico, y una mezcla de los mismos.

20 La composición de la presente invención se puede preparar en una forma de dosificación adecuada para administración tópica, y se puede preparar en cualquiera de diversas formas, tales como una inyección, una suspensión, una emulsión, una pomada, una crema, o un comprimido.

35 3. Agente antitumoral

El agente anti tumoral para uso de la presente invención comprende el liposoma para uso de la presente invención y, como un principio activo, el ARNsh que puede inhibir la expresión de timidilato sintasa (en lo sucesivo en el presente documento denominada "TS") a través de ARNi.

40 El ARNsh que puede inhibir la expresión de TS de acuerdo con la presente invención ejerce una actividad de ARNi específica de TS mediante dirección de ARNm de TS, y por lo tanto de ese modo puede inhibir la expresión de TS de forma notable. La expresión "que se dirige a ARNm" usada en el presente documento se refiere a la situación en la que una hebra antisentido de ARNsh que se describe con detalle a continuación se puede hibridar en condiciones rigurosas al ARNm diana.

50 Las condiciones rigurosas se pueden determinar basándose en la temperatura de (T_m) para ácido nucleico a la que se forma un híbrido de acuerdo con una técnica convencional. En condiciones rigurosas, por ejemplo, las condiciones de lavado que permiten el mantenimiento de la hibridación comprenden generalmente "1 X SSC, SDS al 0,1 %, 37 °C", de forma más estricta "0,5 X SSC, SDS al 01 %, 42 °C", y además de forma estricta "0,1 X SSC, SDS al 0,1 %, 65 °C. "

55 De acuerdo con la presente invención, el ARNsh comprende una hebra codificante que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de nucleótidos del ORF que codifica la TS o una parte de la misma y una hebra no codificante que se hibrida en condiciones rigurosas a la hebra codificante. La expresión "secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de nucleótidos de ORF o una parte del mismo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es idéntica a una secuencia de nucleótidos obtenida por sustitución de timina con uracilo en la secuencia de nucleótidos de ORF o una parte del mismo.

60 La hebra codificante consta de 15 a 25 nucleótidos, y preferentemente 19 nucleótidos. Aunque la secuencia de nucleótidos de la hebra codificante es preferentemente la misma que la secuencia de nucleótidos del ORF que codifica la TS, puede ser esencialmente la misma secuencia; es decir, una secuencia homóloga. De forma específica, la secuencia de nucleótidos de la hebra codificante puede ser diferente de la secuencia de nucleótidos del ORF por sustitución, delección, inserción, y/o adición de uno o más; es decir, de 1 a 3 nucleótidos,

preferentemente 1 o 2 nucleótidos, y más preferentemente 1 nucleótido.

La hebra no codificante comprender la secuencia de nucleótidos que puede hibridarse en condiciones rigurosas a la hebra codificante. Siempre y cuando se pueda hibridar en condiciones rigurosas, la hebra no codificante puede comprender una falta de coincidencia, incluyendo sustitución, deleción, inserción, y/o adición de 1 a 3 nucleótidos, preferentemente 1 o 2 nucleótidos, y más preferentemente 1 nucleótido. La hebra no codificante preferentemente consta de una secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la hebra codificante.

Las secuencias de nucleótidos de la hebra codificante y la hebra no codificante se pueden seleccionar basándose en la secuencia de nucleótidos codificante de TS conocida (GenBank: CR601528.1). Se conocen diversos métodos para seleccionar secuencias de nucleótidos de ese tipo. Por ejemplo, se puede usar el Sistema de Soporte de Diseño de ARNsi (Takara Bio Inc.).

En la presente invención, los ejemplos de hebras codificantes incluyen las que consisten en las secuencias de nucleótidos y se indican a continuación, aunque las hebras codificantes no se limita a las mismas:

5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3' (SEQ ID NO: 1);
 5'-GAAUACAGAGAUUGGAAU-3' (SEQ ID NO: 3);
 5'-CGAUCGAUGAUGUAGAGUGU-3' (SEQ ID NO: 5); y
 5'-GGGUGUUUUGGAGGAGUUGTT-3' (SEQ ID NO: 9).

En la presente invención, el ARNsh comprende preferentemente: la hebra codificante 5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3' (SEQ ID NO: 1) y la hebra no codificante 5'-UCAUGAUCGAUGGUGUUAC-3' (SEQ ID NO: 2); la hebra codificante 5'-GAAUACAGAGAUUGGAAU-3' (SEQ ID NO: 3) y la hebra no codificante 5'-AUUCCAUAUCUCUGUAUUC-3' (SEQ ID NO: 4); la hebra codificante 5'-CGAUCGAUGAUGUAGAGUGU-3' (SEQ ID NO: 5) y la hebra no codificante 5'-ACACUCUACAUCAUGAUCG-3' (SEQ ID NO: 6); o la hebra codificante 5'-GGGUGUUUUGGAGGAGUUGTT-3' (SEQ ID NO: 9) y la hebra no codificante 5'-AACAAUCUCCAAAACACCC-3' (SEQ ID NO: 10).

En la presente invención, el ARNsh comprende más preferentemente la hebra codificante que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y la hebra no codificante que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

Una hebra codificante y una hebra no codificante se conectan entre sí a través de un conector, se pliegan cuando el conector forma un lazo, y la hebra no codificante y la hebra codificante se hibridan entre sí para formar una parte de doble hebra. Siempre y cuando un conector incluido en la molécula de ARNsh pueda conectar la hebra codificante con la hebra no codificante y formar una estructura de tallo-lazo, puede ser un conector polinucleotídico o no polinucleotídico. Un conector es preferentemente, pero no se limita en particular a, un conector polinucleotídico que consiste en 2 a 22 nucleótidos conocido en la técnica. Los ejemplos específicos del mismo incluyen UAGUGCUCUGGUUG (SEQ ID NO: 7), UUCAAGAGA, CCACC, CUCGAG, CCACACC, UUCAAGAGA, AUG, CCC, y UUCG, con UAGUGCUCUGGUUG (SEQ ID NO: 7) siendo preferente.

En la presente invención, el ARNsh comprende una protuberancia que consiste en dos o más nucleótidos en el extremo en la posición 3'.

En la presente invención, el término "protuberancia" se refiere a un nucleótido añadido al extremo en la posición 3' de la hebra no codificante que no tienen nucleótido capaz de unirse de forma complementaria a una posición correspondiente de la hebra codificante. Si una hebra no codificante no tiene una protuberancia en el extremo en la posición 3', el grado de inhibición de la expresión de TS causada por el ARNsh disminuye en aproximadamente un 40 % a un 60 % después de transfección con el uso del liposoma de la presente invención, en comparación con un caso en el que una hebra no codificante tiene una protuberancia en el extremo en la posición 3'. Los tipos y números de nucleótidos que constituyen la protuberancia no se limitan en particular. Por ejemplo, se pueden usar secuencias que consisten en 1 a 5, preferentemente de 1 a 3, y más preferentemente 1 o 2 nucleótidos. Los ejemplos específicos incluyen TTT, UU, y TT, con UU siendo preferente.

En la presente invención, el ARNsh preferente es un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 8.

La hebra codificante o no codificante puede tener el extremo en la posición 5' fosforilado, y puede comprender trifosfato (ppp) unido al extremo en la posición 5', de acuerdo con la necesidad.

Los ARNsh se unen con enlace covalente o no covalente a la superficie de la membrana externa de la bicapa lipídica del liposoma de la presente invención. Con el fin de unir los ARNsh al liposoma, es precedente que una mezcla que contienen los ARNsh y el liposoma se agite de forma vigorosa de 1 a 15 minutos, y preferentemente aproximadamente 10 minutos (por ejemplo, a través de agitación con ultrasonidos). Por lo tanto, un tamaño de partícula del liposoma resultante que comprende ARNsh se puede ajustar a varios cientos de nanómetros

(Barichello, J. M., *et al.*, Int. J. Pharm., 2011). Mediante agitación, además, los ARNsh se pueden dispersar y unir al liposoma de manera uniforme. Esto puede evitar una absorción irregular de liposomas por parte de los tejidos causada por unión no uniforme a ARNsh. Cuando un liposoma es un presoma, como alternativa, el ARNsh se añada una suspensión que contiene el presoma y se mezcla (por ejemplo, mediante agitación vorticial), con el fin de unir el ARNsh a la superficie de la membrana externa de la bicapa lipídica del presoma.

En la presente invención, un tamaño de partícula de un liposoma que tiene ARNsh es de 200 nm a 600 nm, y preferentemente de aproximadamente 300 nm a 400 nm. En la presente invención, también, un tamaño de partícula de un presoma que tiene ARNsh es de 200 nm a 2 μ m, y preferentemente de aproximadamente 300 nm a 1 μ m. En la presente invención, el potencial zeta de un liposoma que tiene ARNsh es de 0 a 50 mV, y preferentemente de aproximadamente 25 a 35 mV.

El liposoma que tiene el ARNsh de la presente invención puede comprender ARNsi o ARNsh que pueden inhibir la expresión de genes que codifican factores expresados en células tumorales, e implicados en el crecimiento de la célula tumoral a través de ARNi, además de ARNsh que puede inhibir la expresión de TS. Se puede usar ARNsi o ARNsh como se ha definido anteriormente. El ARNsh que puede inhibir la expresión de TS y otro ARNsi o ARNsh se puede unir al mismo liposoma, o se puede unir a diferentes liposomas.

En la presente descripción, un liposoma que tiene ARNsh se denomina en ocasiones "lipoplejo", y un presoma que tiene ARNsh en ocasiones se denomina "preplejo".

Como se describe con detalle en los ejemplos que siguen a continuación, el liposoma que tiene ARNsh es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales a través de administración tópica del mismo, y en consecuencia se puede usar para el tratamiento del cáncer.

Los cánceres que se pueden tratar con el uso del agente antitumoral de la presente invención son los que presentan niveles de expresión de TS elevados. Los ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan en particular a, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer del tracto biliar, cáncer de vesícula biliar y de conductos biliares, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer del cuerpo uterino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, mesotelioma pleural maligno, tumor testicular, cáncer de ovario, osteosarcoma un osteosarcoma de tejido blando, cáncer de piel, y tumor cerebral. La pleuresía carcinomatosa y peritonitis carcinomatosa se pueden tratar con el uso del agente antitumoral de la presente invención. Los candidatos para el tratamiento son, por ejemplo, preferentemente cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer del tracto biliar, cáncer de hígado, mesotelioma pleural maligno, cáncer de ovario, peritonitis carcinomatosa, y peritonitis carcinomatosa, y de forma particularmente preferente mesotelioma pleural maligno, cáncer de pulmón no microcítico sin metástasis distante, pleuresía carcinomatosa, metástasis peritoneal por cáncer gástrico, metástasis peritoneal por cáncer de ovario, y peritonitis carcinomatosa.

El agente antitumoral de la presente invención puede comprender adicionalmente, además de un liposoma que tiene ARNsh, un excipiente, un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un diluyente, un solubilizante, un agente de suspensión, un agente de isotonicidad, un regulador del pH, un tampón, un estabilizante, un colorante, un agente saborizante, un agente mejorador del olor, histidina, u otras sustancias que se usan generalmente en la producción de productos farmacéuticos. Se puede usar el excipiente, el lubricante, el aglutinante, el agente disgregante, el diluyente, el estabilizante, el agente de isotonicidad, y el regulador de pH que se han definido anteriormente.

El agente anti tumoral de la presente invención se puede administrar por medio de administración tópica. Las formas de administración tópica son como se han definido anteriormente. La composición de la presente invención se puede preparar en cualquiera de diversas formas de dosificación adecuadas para administración tópica, tales como una inyección, una suspensión, una emulsión, o una pulverización.

Los efectos del agente antitumoral de la presente invención se pueden evaluar mediante administración del agente antitumoral a células o tejidos que se originan a partir de cualquiera de los cánceres que se han descrito anteriormente y a un individuo afectado con cualquiera de los cánceres que se han descrito anteriormente, comparando el tamaño del tumor resultante con el tamaño del tumor en células o tejidos y un individuo al que no se le ha administrado el agente antitumoral (o antes de su administración), y usando la contracción o extinción del tumor como el indicador. Como alternativa, los efectos del agente antitumoral de la presente invención se pueden evaluar administrando el agente antitumoral a células o tejidos que se originan a partir de cualquiera de los cánceres que se han descrito anteriormente y a un individuo afectado con cualquiera de los cánceres que se han descrito anteriormente, y determinando la mejora de la tasa de supervivencia (es decir, efectos que prolongan la vida) y reducción o desaparición de una efusión pleural o ascitis, en comparación con un individuo al que no se le ha administrado el agente antitumoral.

El agente antitumoral de la presente invención se puede usar en combinación con quimioterapia para el cáncer existente o un agente quimioterapéutico para cáncer. La quimioterapia para el cáncer o un agente quimioterapéutico

para cáncer que se puede usar en combinación con el agente anti tumoral de la presente invención no está limitado en particular, con la condición de que pueda modificar las afecciones tumorales, de modo que el liposoma de la presente invención puede invadir fácilmente el tejido tumoral. Un ejemplo de quimioterapia para el cáncer existente es una quimioterapia que implica el uso de "un agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS" que se describe a continuación, y un ejemplo de un agente quimioterapéutico para el cáncer existente es un agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS.

Un "agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS" no está limitado en particular, con la condición de que pueda inhibir funciones de la TS. Los ejemplos del mismo incluyen un agente antitumoral 5-FU, pemetrexed sódico hidratado, raltitrexed (Tomudex), y metotrexato (MTX).

Se ha informado de la correlación entre el nivel de expresión de TS y una respuesta al agente antitumoral 5-FU (Patrick G. Johnston *et al.*, Cancer Res., 1995; 55: 1407-12; y Kun-Huei Yeh *et al.*, Cancer 1998; 82: 1626-31). Entre los pacientes con cáncer, los que presentan un nivel de expresión de TS relativamente bajos muestran una respuesta notable al agente antitumoral 5-FU. Por el contrario, muchos pacientes con cáncer que presentan niveles de expresión de TS relativamente aumentados toleran el agente antitumoral 5-FU. Una correlación similar se observa entre pemetrexed sódico hidratado y los niveles de expresión de TS. A través de la administración del agente antitumoral de la presente invención, la producción de TS en tejidos tumorales se puede suprimir, y una respuesta de los tejidos tumorales al agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS se puede potenciar. Cuando el agente antitumoral de la presente invención se usa en combinación con un agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS, el agente antitumoral de la presente invención se acumula de forma selectiva en tumores, y el ARNsh se puede administrar de forma eficaz a las células tumorales. Con el uso del agente antitumoral de la presente invención en combinación con el agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS, en consecuencia, los efectos antitumorales pueden ser notablemente más elevados que los conseguidos con el uso del agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS o el agente antitumoral de la presente invención solo.

Los ejemplos de agentes antitumorales 5-FU incluyen 5-FU y un derivado de 5-FU a partir de que se produce el 5-FU como un metabolito activo. Un ejemplo de un derivado de 5-FU es un agente que contiene tegafur. Un derivado de 5-FU es preferentemente un compuesto que contiene tegafur, y ejemplos específicos de los mismos incluyen un compuesto farmacológico de tegafur y uracilo (por ejemplo, UFT®, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.) y un compuesto farmacológico de tegafur, gimeracilo, y oteracilo potásico. Entre estos, un compuesto farmacológico de tegafur, gimeracilo, y oteracilo potásico, tal como TS-1® (Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.), es particularmente preferente.

Un ejemplo de pemetrexed sódico hidratado es Alimta® (Eli Lilly Japan K.K.). Al igual que con el caso del agente antitumoral 5-FU, los efectos antitumorales conseguidos con el uso del pemetrexed sódico hidratado en combinación con el agente antitumoral de la presente invención son notablemente más elevados que los conseguidos con el uso del pemetrexed sódico hidratado o el agente antitumoral de la presente invención solos.

El agente antitumoral de la presente invención se puede usar en combinación con otros agentes quimioterapéuticos para el cáncer convencionales, además de o en lugar del agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS. Los ejemplos de los agentes quimioterapéuticos hasta el cáncer de ese tipo incluyen ciclofosfamida, N-óxido de mostaza de nitrógeno, ifosfamida, melfalán, busulfán, mitobronitol, carbocina, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolomida, carmustina, pemetrexed disódico, metotrexato, ribósido de 6-mercaptopurina, mercaptopurina, doxiluridina, carmofur, citarabina, ocfosfato de citarabina, encitabina, gemcitabina, fludarabina, pemetrexed, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, paclitaxel, docetaxel, clorhidrato de irinotecán, y capecitabina. Se puede usar uno o una pluralidad de agentes quimioterapéuticos a la el cáncer seleccionados entre los mismos. Al igual que en el caso del agente antitumoral que tiene acción inhibitoria para la TS, el ARNsh se puede administrar de forma eficaz a células tumorales cuando el agente quimioterapéutico para el cáncer se usa en combinación con el agente antitumoral de la presente invención. Los efectos antitumorales conseguidos de ese modo pueden ser notablemente más elevados que los conseguidos con el uso del agente quimioterapéutico para el cáncer o el agente antitumoral de la presente invención solos.

Siempre y cuando el agente antitumoral de la presente invención se administre en combinación con el agente quimioterapéutico para el cáncer existente, estos agentes se pueden proporcionar en forma de un "producto combinado".

El agente antitumoral de la presente invención se puede preparar en forma de un "producto combinado" en combinación con el agente quimioterapéutico para el cáncer existente. Un "producto combinado" de ese tipo puede ser un compuesto farmacológico que contiene el agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico para el cáncer existente como principios activos. Además, se puede producir, envasar y distribuir un solo envase (un kit de formulación) que contiene el agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico para el cáncer existente adecuado para administración combinada.

La expresión "administración combinada" puede hacer referencia no solamente a administración simultánea del agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico para el cáncer existente sino también a

administración del agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico para el cáncer existente a ciertos intervalos. La vía de administración y el medio para la administración del agente antitumoral de la presente invención pueden ser iguales o diferentes a los del agente quimioterapéutico para el cáncer existente.

- 5 La dosis y la frecuencia de administración del agente antitumoral de la presente invención puede variar dependiendo de factores, tales como la edad y el peso corporal de un paciente y la gravedad de la enfermedad. El agente antitumoral se puede administrar a una sola dosis seleccionada de forma apropiada desde el intervalo de 0,0001 mg a 100 mg en términos de la cantidad de ARNsh por kg del peso corporal, de 1 a 3 veces cada día o cada 1 a 21 días.
- 10 La dosis del agente quimioterapéutico para el cáncer existente puede variar dependiendo de factores, tales como un tipo de una sustancia química como un principio activo, la edad y el peso corporal de un paciente, y la gravedad de la enfermedad. El agente quimioterapéutico para el cáncer existente se puede administrar a una sola dosis seleccionada de forma apropiada entre el intervalo de 0,0001 mg a 1000 mg por kg del peso corporal, de 1 a 3 veces cada día o cada 1 a 14 días. Cuando el agente quimioterapéutico para el cáncer existente es un agente antitumoral
- 15 5-FU, por ejemplo, se puede administrar una dosis diaria de 60 a 160 mg en términos de tegafur cada día o cada 1 a 7 días. Cuando el agente quimioterapéutico para el cáncer existente es pemetrexed sódico hidratado, éste se puede administrar a una dosis diaria de 500 a 1000 mg cada día o cada 1 a 7 días. El agente quimioterapéutico para el cáncer existente se puede administrar a dosis y frecuencias menores cuando se usa en combinación con el agente antitumoral de la presente invención en comparación con un caso en el que se administra solo. Esto puede suprimir
- 20 o retrasar el desarrollo de efectos secundarios que pueden estar producidos por la administración de los agentes quimioterapéuticos para el cáncer existentes. Los ejemplos de efectos secundarios incluyen, pero no se limitan a, supresión de médula ósea, anemia hemolítica, síndrome de coagulación intravascular diseminada, insuficiencia hepática fulminante, deshidratación, enteritis, neumonía intersticial, estomatitis, ulcera del tracto gastrointestinal, hemorragia del tracto gastrointestinal, perforación del tracto gastrointestinal, insuficiencia renal aguda, síndrome muco-cutáneo-ocular, necrólisis epidérmica tóxica, trastorno psiconeurótico, pancreatitis aguda, rabdomiólisis, y anosmia.
- 25

Ejemplos

- 30 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe con mayor detalle en referencia a los ejemplos que siguen a continuación, aunque la presente invención no se limita a estos ejemplos.

[Ejemplo 1]

- 35 Efectos inhibitorios en el crecimiento celular con el uso de ARNsh de dirección a TS en combinación con Alimta *in vitro*

(ARNsh de dirección a TS)

- 40 El ARNsh de dirección a TS (en lo sucesivo en el presente documento denominado "ARNsh de TS") que tiene la secuencia que se demuestra a continuación se sintetizó basándose en el ARNsh conocido capaz de inhibir la expresión de TS que se confirmó que tenía los efectos antitumorales (véase el documento WO 2012/161196).

ARNsh de TS:

45

5'-GUAACACCAUCGAUCAUGAUAGUGCUCUCCUGGUUGUCAUGAUCGAUGGUG
UUACUU-3' (SEQ ID NO: 8)

- 50 Por el contrario, el ARNsh que tiene la secuencia que se demuestra a continuación que no se dirige a ningún ARNm se usó como un control. En lo sucesivo en el presente documento, el ARNsh de control se denomina "ARNsh de NS".

ARNsh de NS:

5'-UCUAAUCGCGUAUAAGGCUAGUGCUCUCCUGGUUGGCCUUAUACGCGAUU
AAGAUU-3' (SEQ ID NO: 11)

55

(Ensayo de MTT)

Este experimento se realizó en una escala de placa de 96 pocillos. La transfección se realizó usando Lipofectamina® RNAi MAX (en lo sucesivo el presente documento denominado "Lf RNAi MAX"), que es un liposoma catiónico, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ARNsh (300 pmol of ARNsh de TS o ARNsh de NS) y 15 µl de Lf RNAi MAX se diluyeron por separado con OptiMEM para preparar soluciones (500 µl cada una), las soluciones resultantes se mezclaron entre sí, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente de 10 a 20 minutos para formar un complejo (es decir, un lipoplejo). Una suspensión de células de mesotelioma pleural maligno humano (MSTO-211H) (2.000 células/100 µl) se añadió a los pocillos, 50 µl de lipoplejo se añadieron a esto 24 horas a partir de ese momento, y el volumen total final se ajustó a 150 µl (la concentración de ARNsh final en los pocillos se ajustó a 5 nM o 10 nM). El medio se retiró 24 horas después del inicio de la transfección, y 200 µl de un medio recién preparado que contenía o no contenía un agente quimioterapéutico para el cáncer existente ("Alimta", pemetrexed sódico hidratado, PMX, Eli Lilly) a 0,01 µg/ml se añadió a esto. El medio se retiró 0, 24, 48, 72, y 96 horas después de la adición del medio recién preparado. A esto se le añadió una solución al 0,5 % de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (50 µl), y la incubación se realizó a continuación a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante 4 horas. Además, la solución de MTT al 0,5 % se añadió a pocillos sin células para obtener un fondo.

Después de la finalización de la incubación, se añadió isopropanol ácido (150 µl) a cada pocillo. Los cristales de Formazán se disolvieron usando un agitador. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 570 nm usando un lector de placas. A continuación la tasa de crecimiento celular se calculó usando la ecuación que se demuestra a continuación.

$$\text{Tasa de crecimiento celular (\%)} = \frac{[A570 \text{ (X horas después de la adición de medio recién preparado)}] - A570 \text{ (0 horas después de la adición de medio recién preparado)}}{A570 \text{ (0 horas después de la adición de medio recién preparado)}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Fig. 1.

Como se muestra en la Fig. 1, el ARNsh de TS inhibió el crecimiento de las células MSTO-211H hasta un alcance significativo en presencia de PMX de una manera dependiente del tiempo.

[Ejemplo 2]

Inhibición de la expresión de TS por ARNsh de TS

(Transfección)

La transfección se realizó usando Lipofectamina® RNAi MAX (en lo sucesivo en el presente documento denominada "Lf RNAi MAX"), que es un liposoma catiónico, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En el presente documento se usó el lipoplejo preparado en el Ejemplo 1.

Una suspensión de células MSTO-211H (10 ml) se sembró en una placa de 10 cm (500.000 células/placa), y el cultivo se realizó durante 24 horas con antelación. Cada lipoplejo se añadió directamente a esto, con el fin de ajustar el volumen total final a 15 ml, seguido de transfección. La concentración final de ARNsh de TS o NS-ARNsi se ajustó a 5 o 10 nM. El control no se trató con ARNsh. Después del inicio de la transfección, el cultivo se realizó en un medio a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante 72 horas, y el estrato celular se preparó a continuación con el método que se describe a continuación.

(Preparación del extracto celular)

Setenta y dos horas después del inicio de la transfección, el medio se retiró, seguido de lavado con PBS(-) frío. A partir de ese momento, las células se desprendieron de la placa usando una solución de tripsina, y el sobrenadante se retiró por centrifugación. Además, se realizó lavado con PBS(-) frío, y a esto se le añadieron de 100 a 50 µl de tampón de lisis frío (Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NP-40 al 1 %, desoxicolato sódico al 0,25 %, NaCl 150 mM, y Cóctel Inhibidor de Proteasa (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.)). A continuación la incubación se realizó sobre hielo (4 °C durante 1 hora) para lisis celular. Posteriormente, se realizó centrifugación (15.000 x g, 15 minutos, 4 °C), y el sobrenadante obtenido se usó como un extracto celular.

(Preparación de muestra de SDS-PAGE)

El extracto celular mencionado anteriormente se mezcló con la cantidad equivalente de un tampón de muestra 2x, producto resultante se calentó usando una placa caliente para microtubos a 95 °C durante 3 minutos.

Posteriormente, la centrifugación se realizó durante 30 segundos, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente. Por lo tanto, se obtuvo una muestra de SDS-PAGE.

(SDS-PAGE)

5 La muestra (6 μ l que corresponde a 9 μ g de proteína/calle) se aplicó a gel de poliacrilamida al 12 %, el gel se conectó a una fuente de energía (Bio-Rad laboratories), y la electroforesis se realizó durante aproximadamente 80 minutos a una corriente constante de 40 mA para dos láminas de gel (20 mA para una sola lámina de gel).

10 (Transferencia puntal de Western)

Para tratamiento previo el filtro de papel y Hybond-ECL cortados en trozos de tamaños adecuados se sumergieron en tampón de transferencia puntal. Después de SDS-PAGE, un aparato de transferencia se usó para transferir una proteína a Hybond-ECL. El Hybond-ECL resultante se sometió a bloqueo (en leche desnatada al 5 %) a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavó 3 veces durante 5 minutos cada uno con tampón Tween.

20 Para detección de TS y β -actina, se permitió que los anticuerpos primarios cada uno diluido con tampón Tween (es decir, un anticuerpo de TS anti-humano monoclonal de ratón (1:1000) (ANASPEC, Inc., CA, U.S.A.) y un anticuerpo de β -actina anti-humano monoclonal de ratón (1:500) (Abcam, Tokio, Japón)) reaccionaran cada uno a 4 °C durante una noche. Después de lavar con tampón Tween 3 veces durante 5 minutos cada uno, se permitió que una solución de anticuerpo secundario (un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP (1:2000) (ICN Biomedical, CA, U.S.A.)) diluida con tampón Tween reaccionara a temperatura ambiente durante 1 hora. El lavado con tampón Tween 3 veces durante 5 minutos cada uno fue seguido de una reacción con un reactivo de quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) durante aproximadamente 1 minuto. La banda de proteína diana se visualizó usando el LAS-4000 EPUVmini (FujiFilm), se fotografió y a continuación se cuantificó con el uso del software (Multi Gauge v.3.2, FujiFilm, Tokio, Japón).

Los resultados se muestran en la Fig. 2.

30 Como se muestra en la Fig. 2, se encontró que el lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa preparado en el Ejemplo 1 inhibía la expresión de TS en las células MSTO-211H de una manera específica de la secuencia independiente de la concentración hasta un alcance significativo.

[Ejemplo 3]

35 Inhibición de expresión de luciferasa con Luciferasa-ARNsh *in vitro*

(Preparación de línea celular que expresa luciferasa)

40 El plásmido de expresión en el que se había introducido el gen de luciferasa ha obtenido a partir de luciérnaga (pGL3-control, Promega) y el plásmido de expresión en el que se había introducido al agente luciferasa obtenido a partir de *Renilla reniformis* (pRL-TK, Promega) se sometieron a transfección usando Lipofectamina® 2000 (Lf 2000), que es un liposoma catiónico, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 Una suspensión de células HT-1080 se sembró en una placa de cultivo celular de 12 pocillos a 100.000 células/pocillo (1 ml), y el cultivo se realizó durante 12 horas con antelación. Después de retirar el sobrenadante del cultivo y realizar el lavado con PBS se realizó una de, a cada pocillo se añadió una solución de transfección (200 μ l) que contenía ambos los nidos de expresión para la luciferasa, y los plásmidos que expresan luciferasa se sometieron a transfección. La concentración final de cada plásmido se ajustó a 1 μ g/200 μ l. Después del inicio de la transfección, el cultivo se realizó a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 %.

(Preparación de liposoma catiónico)

Los liposomas catiónicos se prepararon con el método que se describe a continuación.

55 Los lípidos que constituyen el liposomas se seleccionaron entre los siguientes lípidos: DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina); POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina); DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina); y DC-6-14 (cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetil-amonioacetil)dietafolina). Estos lípidos se disolvieron en cloroformo con antelación para preparar soluciones de reserva.

60 Una muestra se recogió de cada solución de reserva mediante medición precisa con el uso de una jeringa de vidrio con el fin de conseguir la siguiente composición de lípido: DOPE:X:DC-6-14 = 3:2:5 (proporción molar; en la que X representa DOPC o POPC). Las muestras se introdujeron en un tubo de ensayo con tapón y se mezclaron en el mismo (la cantidad de lípido total: 200 mmol). Posteriormente, el cloroformo se retiró del mismo a presión reducida usando un evaporador rotatorio (IWAKI, Tokio), y el tubo de ensayo se puso en una bomba de vacío durante una

noche, con el fin de retirar completamente el cloroformo. Por lo tanto, una película fina de lípido se formó en el tubo de ensayo. 2 ml de solución de sacarosa al 9 % (30 ml, pH 7.4) se añadieron como una fase acuosa interna a la película fina de lípido, seguido de agitación vigorosa a 37 °C. Por lo tanto, la película fina de lípido se hidroliza completamente con el fin de que se de que se formaran las MLV (vesículas multilamelares) (concentración de lípido final: 100 mM). La solución obtenida se calentó a 37 °C, durante lo cual las LUV (vesículas unilamelares grandes) que tenían tamaños de partícula de aproximadamente 100 nm se prepararon usando membranas de policarbonato de 200, 100, y 50 nm (Nucleopore, CA, U.S.A.) con un método de extrusión.

(ARNsh que se dirige a Luciferasa (Luc))

El ARNsh que se dirige a Luc (en lo sucesivo en el presente documento denominado "ARNsh de Luc") tiene la secuencia que se muestra a continuación.

ARNsh de Luc:

**5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAUAGUGCUCCUGGUUGUCGAAGUACUCAGCG
UAAGUU-3' (SEQ ID NO: 12)**

(Preparación de lipoplejo)

Los lipoplejos se prepararon mezclando los liposomas catiónicos con los ARNsh a una tasa del liposoma catiónico con respecto a ARNsh de 800, 400, o 200:1 (proporción molar) y agitando vigorosamente la mezcla durante 10 minutos. Tanto si el ARNsh se había adsorbido completamente o no los liposomas catiónicos se inspeccionó confirmando la ausencia de ARNsh libre a través de electroforesis sobre gel de agarosa al 2 %.

(Inhibición de expresión de luciferasa *in vitro*)

Cada lipoplejo se añadió a las células que expresan luciferasa para dar como resultado la concentración final de ARNsh de 50 nM, y el cultivo se realizó en un medio a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante 48 horas. Después de finalizar el cultivo, los extractos celulares se prepararon y la actividad grasa se sometió al ensayo usando el Sistema de Ensayo de Indicador de Luciferasa Doble (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la finalización del cultivo, de forma específica, se realizó la retirada del medio, lavando con PBS(-) frío, se añadió tampón de lisis pasiva a 150 µl/pocillo, y la incubación se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación con el uso de un agitador rotatorio para lisis celular. A continuación el producto resultante se transfirió a tubos de muestra, se enfrió a -80 °C durante 30 minutos, y a continuación se volvió a llevar a temperatura ambiente. El producto se centrifugó a 4 °C y 9.000x g durante 30 segundos, y el sobrenadante resultante se usó como un extracto celular. Posteriormente, 10 µl cada extracto celular se añadieron a la microplaca de color blanco de 96 pocillos que comprendía 50 µl cada uno de la solución de Reactivo II de Ensayo de Luciferasa fraccionada, y las células se mezclaron usando una pipeta. La microplaca se montó en el luminómetro (Infinite M200 Pro, Tecan), y la quimioluminiscencia causada por la actividad de luciferasa de luciérnaga se evaluó durante 10 segundos. A partir de ese momento, la placa se retiró, la solución de Reactivo Stop&Glo se añadió a la placa a 50 µl/pocillo, y se mezcló a través de agitación vorticial suave. Inmediatamente a partir de ese momento, la quimioluminiscencia causada por la actividad de luciferasa de *Renilla reniformis* se sometió a ensayo usando un luminómetro de la misma manera. En el análisis de los datos, el nivel de actividad de luciferasa de *Renilla reniformis* se estandarizó como la muestra de control interno, y se determinó la actividad de luciferasa de luciérnaga con respecto al grupo de control que no se sometió a ARNsh.

Los resultados se muestran en la Fig. 3. Los resultados que se muestran en la Fig. 3 son con respecto a la actividad de luciferasa del control designado como un 100 %.

Como se muestra en la Fig. 3, se observó una reducción de la actividad de luciferasa con el uso de lipoplejo que comprendía DOPC o POPC en comparación con el grupo de control que no se sometió a tratamiento con ARNsh de Luc. Esto indica que el lipoplejo que comprende ARNsh de Luc unido a su superficie de membrana externa es capaz de inhibir la expresión de luciferasa en células HT-1080. En comparación con el lipoplejo que comprende POPC, además, se encontró que el lipoplejo que comprende DOPC presentaba efectos de inhibición de la expresión por ARNsh de Luc más elevados. Cuando la proporción molar de ARNsh de Luc con respecto al liposoma catiónico es 1:800, además, se encontró que los efectos de inhibición de expresión por ARNsh de Luc eran elevados.

[Ejemplo 4]

Establecimiento de modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno

Bajo anestesia con 2,2,2-tribromoetanol (Avertin; Sigma-Aldrich), se implantaron 100 µl de una suspensión de células MSTO-211H (células MSTO-211H-Luc) que expresan luciferasa de forma estable en la cavidad pleural izquierda de un ratón atímico (macho de 5 semanas de edad). Bajo anestesia con isoflurano, se administraron 100 µl de una sal potásica de D-luciferina (Wako Pure Chemical) (7,5 mg/ml) por vía intraperitoneal, 3, 7, 14, y 21 días después del implante de las células, y los niveles de bioluminiscencia dependiendo de la actividad de las células MSTO-211H-Luc que se habían cultivado en la cavidad torácica se evaluaron usando IVIS (Xenogen, Alameda, CA, U.S.A.).

Los resultados se muestran en la Fig. 4.

Como se muestra en la Fig. 4, una bioluminiscencia insignificante se observó después del crecimiento de las células MSTO-211H-Luc, 3 días después del implante, y a continuación la bioluminiscencia se aumentó con el transcurso del tiempo. Esto indica que las células MSTO-211H-Luc implantadas se cultivaron de forma suficiente en la cavidad torácica. Por lo tanto, se establecieron los modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno.

[Ejemplo 5]

Selección de liposoma catiónico que presenta efecto suficiente de introducción de ARNsh *in vivo*

(Preparación de liposoma catiónico)

Los liposomas catiónicos se prepararon con el método que se describe a continuación.

Los lípidos que constituyen el liposoma se seleccionaron entre los siguientes lípidos: DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina); POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina); DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina); DEPC (1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfolina); DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina); y DC-6-14 (cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetil-amonioacetil)dietaolamina). Estos lípidos se disolvieron en cloroformo con antelación para preparar soluciones de reserva.

Una muestra se recogió de cada solución de reserva mediante medición precisa con el uso de una jeringa de vidrio con el fin de conseguir la siguiente composición de lípido: DOPE:X:DC-6-14 = 3:2:5 (proporción molar), y los liposomas catiónicos se prepararon de acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 3. Los tamaños de partícula (el método de dispersión dinámica de luz) y los potenciales zeta (el método de dispersión de luz por electroforesis) de los liposomas se determinaron usando un NICOMP 370 (Particle Sizing System, CA, U.S.A.). Las cargas superficiales de los liposomas eran aproximadamente + 50 mV.

(ARNsh de dirección a Luciferasa (Luc))

Se usó el ARNsh de Luc que se ha descrito en el Ejemplo 3.

(Preparación de lipoplejo)

Los lipoplejos se prepararon mezclando los liposomas catiónicos con los ARNsh a una proporción de 2000:1 (proporción molar) y agitando la mezcla vigorosamente durante 10 minutos. Tanto si los ARNsh se habían adsorbido completamente o no los liposomas catiónicos se inspeccionó confirmando la ausencia de ARNsh libre a través de electroforesis sobre gel de agarosa al 2 %.

El tamaño de partícula promedio y el potencial zeta de los liposomas preparados era aproximadamente 350 nm y aproximadamente + 15 mV, respectivamente.

(Inhibición de expresión de luciferasa usando modelos de ratón de implante ortotópico *in vivo*)

Con anestesia de 2,2,2-tribromoetanol (Avertin; Sigma-Aldrich), 100 µl una suspensión de células MSTO-211H (células MSTO-211H-Luc) expresaban de forma estable luciferasa se implantaron en la cavidad pleural izquierda de un ratón atímico (macho de 5 semanas de edad). El lipoplejo se administró directamente en la cavidad torácica 10, 13, 16, y 19 días después del implante celular, de modo que pudieran administrar 20 µg (50 µl) de ARNsh. Bajo anestesia con isoflurano, se administraron 100 µl de una sal potásica de D-luciferina (7,5 mg/ml) por vía intraperitoneal, 2 días después de la administración final del lipoplejo, y los niveles de bioluminiscencia dependiendo de la actividad de las células MSTO-211H-Luc que se habían cultivado en la cavidad torácica se evaluaron usando IVIS (Xenogen, Alameda, CA, U.S.A.).

Al control se le administró una solución de sacarosa al 9 %.

Los resultados se muestran en la Fig. 5-1 y en la Fig. 5-2.

Como se muestra en la Fig. 5-1 y en la Fig. 5-2, se encontró que el grado de inhibición de expresión de luciferasa podría estar influido por la composición de lípido del liposoma catiónico usado y el del lipoplejo preparado con el uso del liposoma catiónico con la composición de lípido de DOPE/DOPC/DC-6-14 (3:2:5) podría inhibir la expresión de luciferasa en las células MSTO-211H-Luc que se habían implantado en la cavidad torácica, en la mayor medida.

5

[Ejemplo 6]

Influencia del lípido con carga positiva (contenido de DC-6-14) después de introducción de ARNsh *in vivo*

10 (Preparación de liposoma catiónico)

Los liposomas se prepararon de acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 3; sin embargo, la composición de lípido de los liposomas se ajustó a DOPE:POPC:DC-6-14 de 3:2 + X:5-X (proporción molar, en la que X es 0, 1,5, o 3,0). Los tamaños de partícula y las cargas superficiales de los liposomas se determinaron usando un NICOMP 370 (Particle Sizing System, CA, U.S.A.). Se confirmó que todas las LUV (vesículas unilamelares grandes) tenían tamaños de partícula de aproximadamente 100 nm. Se encontró que la carga superficial de un liposoma que contenía DC-6-14 a un 20 % era aproximadamente + 25 mV, se encontró que la del liposoma que contenía DC-6-14 a un 35 % era aproximadamente + 35 mV, y se encontró que la del liposoma que contenía DC-6-14 a un 50 % era aproximadamente + 50 mV.

20

(Preparación de lipoplejo)

Los lipoplejos se prepararon mezclando los ARNsh de Luc que se han descrito en el Ejemplo 3 con liposomas con el método que se ha descrito en el Ejemplo 3. Los tamaños de partícula (el método de dispersión dinámica de luz) y los potenciales zeta (el método de dispersión de luz por electroforesis) de los liposomas se determinaron usando un NICOMP 370 (Particle Sizing System, CA, U.S.A.). El tamaño de partícula y la carga superficial del lipoplejo que contenía DC-6-14 a un 20 % eran aproximadamente 350 nm y aproximadamente + 25 mV, respectivamente. El tamaño de partícula y la carga superficial del lipoplejo que contenía DC-6-14 a un 35 % eran aproximadamente 350 nm y aproximadamente + 30 mV, respectivamente. El tamaño de partícula y la carga superficial del lipoplejo que contenía DC-6-14 a un 50 % eran aproximadamente 350 nm y aproximadamente + 35 mV, respectivamente.

25

30

(Inhibición de expresión de luciferasa usando modelos de ratón de implante ortotópico *in vivo*)

De acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 5, se evaluaron los efectos de los lipoplejos preparados para inhibir la expresión genética *in vivo* (la eficacia para introducción de ARNsh en células).

35

Los resultados se muestran en la Fig. 6-1 y en la Fig. 6-2.

Como se muestra en la Fig. 6-1 y en la Fig. 6-2, se encontró que los efectos inhibitorios del lipoplejo en la expresión de luciferasa se podrían potenciar *in vivo* ya que la cantidad de lípido con carga positiva (DC-6-14) aumentó en el liposoma. Un aumento de la carga superficial es ventajoso cuando se forma un complejo de un liposoma con un ARNsh con carga negativa. Además, las interacciones con células tumorales con carga negativa se podrían facilitar debido a un aumento de la carga superficial. Como resultado, en las células se puede introducir una gran cantidad de ARNsh de forma eficaz.

40

45

[Ejemplo 7]

Influencia de la modificación de PEG en la introducción de ARNsh *in vivo*

50 (Preparación de liposoma catiónico modificado con PEG)

Los liposomas se prepararon de acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 3.

Los lípidos que constituyen liposomas se seleccionaron entre los siguientes lípidos: DOPC, POPC, DOPE, DC-6-14, y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (mPEG2000-DSPE). La composición del lípido del liposoma modificado con PEG se ajustó a DOPE:X:DC-6-14:mPEG-DSPE=3:2:5:0,1 (proporción molar, en la que X representa DOPC o POPC), la composición del lípido del liposoma no modificado con PEG se ajustó a DOPE:X:DC-6-14 de 3:2:5 (proporción molar, en la que X representa DOPC o POPC), y a continuación se prepararon las LUV (vesículas unilamelares grandes). Los tamaños de partícula de los liposomas se determinaron usando NICOMP 370 (Particle Sizing System, CA, U.S.A.). El tamaño de partícula y la carga superficial del liposoma que contenía DOPC (el liposoma no modificado con PEG) eran aproximadamente 100 nm y aproximadamente + 50 mV, respectivamente. El tamaño de partícula y la carga superficial del liposoma que contenía POPC (el liposoma no modificado con PEG) eran aproximadamente 110 nm y aproximadamente + 50 mV, respectivamente. El tamaño de partícula y la carga superficial del liposoma modificado con PEG que contenía DOPC (el liposoma modificado con PEG) eran aproximadamente 106 nm y aproximadamente + 50 mV, respectivamente. El tamaño de

55

60

65

partícula y la carga superficial del liposoma modificado con PEG que contenía POPC (el liposoma modificado con PEG) eran aproximadamente 100 nm y aproximadamente + 50 mV, respectivamente.

(Preparación de lipoplejo)

5 Los lipoplejos se prepararon mezclando los ARNsh de Luc que se han descrito en el Ejemplo 3 con los liposomas modificados con PEG o liposomas no modificados con PEG con el método que se ha descrito en el Ejemplo 3. Los tamaños de partícula (el método de dispersión dinámica de luz) y los potenciales zeta (el método de dispersión de luz por electroforesis) de los lipoplejos se determinaron usando un NICOMP 370 (Particle Sizing System, CA, U.S.A.). El tamaño de partícula y la carga superficial del lipoplejo que contenía DOPC eran aproximadamente 350 nm y aproximadamente + 30 mV, respectivamente. El tamaño de partícula y la carga superficial del lipoplejo que contenía POPC eran aproximadamente 360 nm y aproximadamente + 30 mV, respectivamente. El tamaño de partícula y la carga superficial del lipoplejo modificado con PEG que contenía DOPC eran aproximadamente 370 nm y aproximadamente + 30 mV, respectivamente. El tamaño de partícula y la carga superficial del lipoplejo modificado con PEG que contenía POPC eran aproximadamente 370 nm y aproximadamente + 30 mV, respectivamente.

(Inhibición de expresión de luciferasa usando modelos de ratón de implante ortotópico *in vivo*)

20 De acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 5, se evaluaron los efectos del lipoplejo modificado con PEG preparado o lipoplejo no modificado con PEG para inhibir la expresión genética *in vivo* (la eficacia para introducción de ARNsh en células).

Los resultados se muestran en la Fig. 7-1 y en la Fig. 7-2.

25 Como se muestra en la Fig. 7-1 y en la Fig. 7-2, se encontró que los efectos inhibitorios del lipoplejo en la expresión de luciferasa se podrían inhibir a través de modificación con PEG, independientemente de la composición del lípido del liposoma catiónico usado. Aunque la PEGilación era necesaria en el caso de administración intravenosa, se encontró que la modificación con PEG podría deteriorar la eficacia para introducción de ARNsh en células en el caso de administración intratorácica.

30 [Ejemplo 8]

Efectos de inhibición del crecimiento tumoral a través de administración intratorácica de lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa en modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno

(Establecimiento de modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno)

40 Los modelos de ratón de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno usando las células MSTO-211H-Luc se prepararon con el método que se ha descrito en el Ejemplo 3, y los ratones en los que las células se habían implantado se fijaron lo suficiente 7 días después del implante se sometieron a experimento *in vivo*.

(Preparación de liposoma catiónico)

45 Los liposomas se prepararon de acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 3; sin embargo, la composición del lípido de los liposomas se ajustó a DOPE:POPC:DC-6-14 de 3:2:5.

(Preparación de lipoplejo)

50 Los lipoplejos se prepararon mezclando los ARNsh que se han descrito en el Ejemplo 1 con los liposomas con el método que se ha descrito en el Ejemplo 3. Los tamaños de partícula (el método de dispersión dinámica de luz) y los potenciales zeta (el método de dispersión de luz por electroforesis) de los lipoplejos se determinaron usando un NICOMP 370 (Particle Sizing System, CA, U.S.A.). El tamaño de partícula del lipoplejo que tiene ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "lipoplejo de ARNsh de TS") era aproximadamente 400 nm, y la carga superficial del mismo era aproximadamente + 30 mV. Por el contrario, el tamaño de partícula del lipoplejo que tiene ARNsh de NS unido a su superficie de membrana externa (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "lipoplejo de ARNsh de NS") era aproximadamente 400 nm, y la carga superficial del mismo era aproximadamente + 30 mV.

60 (Evaluación de efectos de lipoplejo de ARNsh de TS en la inhibición del crecimiento tumoral)

El lipoplejo de ARNsh de TS o lipoplejo de ARNsh de NS se administró directamente en la cavidad torácica de un ratón que portaba células MSTO-211H-Luc cada dos días de 7 días a 17 días después del implante del tumor, y la administración se realizó 6 veces en total. Una dosis era 20 µg de ARNsh/100 µl.

65 Cuando un agente quimioterapéutico para el cáncer existente (Alimta; pemetrexed sódico hidratado (PMX), Eli Lilly)

se usó en combinación, una dosis de 25 mg/kg se administró por vía intraperitoneal cada día de 7 días a 11 días después del implante del tumor, la misma cantidad del agente se administró por vía intraperitoneal después de un intervalo de 2 días cada día de 14 días a 18 días después del implante del tumor, y la administración se realizó 10 veces en total.

5 Una solución de sacarosa al 9 % se administró al control.

10 Como se ha descrito en el Ejemplo 5, la actividad carcinostática (es decir, la actividad inhibitoria del crecimiento celular) se evaluó implantando células MSTO-211H-Luc, administrando 100 µl de una solución de sal potásica de D-luciferina (7,5 mg/ml) por vía intraperitoneal con anestesia con isoflurano 21 días después del implante, y evaluando los niveles de bioluminescencia dependiendo de la actividad de las células MSTO-211H-Luc que se habían cultivado en la cavidad torácica usando IVIS (Xenogen, Alameda, CA, U.S.A.).

15 Los efectos que prolongan la vida basándose en los efectos carcinostáticos se evaluaron criando continuamente modelos de ratón que se habían sometido a la evaluación basada en IVIS hasta 47 días después del implante celular sin tratamiento.

Los tiempos medios de supervivencia (MST; el número de días) se evaluaron basándose en la siguiente ecuación.

$$\text{MST (el número de días)} = \frac{\text{el día en el que el primer ratón murió} + \text{el día en el que el último ratón murió}}{2}$$

20 El aumento de la esperanza de vida (%) se determinó de acuerdo con la siguiente forma:

$$\text{ILS (\%)} = \left[\frac{\text{tiempo medio de supervivencia para grupo de tratamiento}}{\text{tiempo medio de supervivencia para grupo de control}} \right] \times 100$$

25 Los resultados se muestran en las Figs. 8-1, 8-2, 8-3, y 8-4.

30 Como se muestra en las Figs. 8-1 y 8-2, los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral no se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de NS solo en comparación con el grupo de control. Por el contrario, aproximadamente un 50 % de los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de TS o PMX solo. Además, los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral sustancialmente los mismos que los observados en el grupo sometido a tratamiento con PMX solo se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de NS en combinación con PMX. Sin embargo, los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral significativos tan elevados como aproximadamente un 90 % se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de TS en combinación con PMX.

40 Como se muestra en las Figs. 8-3 y 8-4, esencialmente no se observaron efectos que prolongaran la vida en el grupo sometido a tratamiento con el de lipoplejo de ARNsh de NS solo en comparación con el grupo de control. Por el contrario, los efectos que prolongan la vida insignificantes (de un 120 % a un 126 %) se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de TS o PMX solo. Además, los efectos que prolongan la vida (122 %) esencialmente los mismos que los observados en el grupo sometido a tratamiento con PMX solo se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de NS en combinación con PMX. Sin embargo, los efectos máximos que prolongan la vida (178 %) que reflejan los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de TS en combinación con PMX.

45 En ninguno de los grupos de tratamiento se observó una toxicidad grave, incluyendo inhibición del aumento de peso.

50 [Ejemplo 9]

Examen de inhibición de expresión genética diana a través de administración intratorácica de lipoplejo de ARNsh de TS

55 Los ratones de los grupos sometidos a tratamiento de la misma manera que en el Ejemplo 8 se sometieron a evaluación a través de IVIS 21 días después del implante de las células MSTO-211H-Luc, los ratones se sacrificaron, las células tumorales se recogieron de la cavidad torácica, y la inhibición de la expresión genética de TS en las células tumorales recogidas se evaluó a través de RT-PCR cuantitativa.

El ARN se extrajo de células tumorales usando el kit RNeasy-micro (Ambion, Austin, TX, U.S.A.) de acuerdo con

el método recomendado por el fabricante. La transcripción inversa del ARN en ADNc se realizó con la adición de Oligo (dT)20, dNTP, inhibidor de RNasa, y ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japón) a ARN. La PCR en tiempo real se realizó usando el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, CA, U.S.A.), el ADNc transcrito de forma inversa como el molde, y FastStart TaqMan Probe Master (ROX) y Universal ProbeLibrary (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) como reactivos, de acuerdo con el método recomendado por el fabricante. El GAPDH se usó como patrón interno.

Los resultados se muestran en la Fig. 9.

Como se muestra en la Fig. 9, no se observaron efectos inhibitorios en el gen TS en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de NS solo en comparación con el grupo de control. Por el contrario, aproximadamente un 50 % o aproximadamente un 25 % de los efectos inhibitorio del gen TS se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de TS o PMX solo. Además, aproximadamente un 20 % de los efectos inhibitorios del gen TS, que eran sustancialmente los mismos que los observados en el grupo sometido a tratamiento con PMX solo, se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de NS en combinación con PMX. En el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de ARNsh de TS en combinación con PMX que había presentado los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral, más elevados, en el Ejemplo 8, esencialmente no permanecían células tumorales en la cavidad torácica debido a efectos inhibitorios elevados. Por consiguiente, no fue posible medir cambios en la expresión del gen TS.

[Ejemplo 10]

Influencia de la configuración de la mezcla de lípidos en la introducción de ARNsh *in vitro*

Preparación de presoma catiónico

En el presente documento se usó la composición del lípido usada en el Ejemplo 3; es decir, DOPE:X:DC-6-14=3:2:5 (X representa DOPC o POPC).

Los lípidos se midieron con el fin de conseguir la composición del lípido que se ha descrito anteriormente, y ciclohexano en una cantidad de 10 veces la cantidad del lípido total en peso y etanol en una cantidad de un 2 % de ciclohexano en peso se añadieron para lisar los lípidos en agua tibia a 70 °C. El lisado se filtró a través de un filtro de membrana de PTFE de 0,2 µm, y la solución filtrada se congeló con hielo seco/acetona. Después de la finalización de la congelación, un secado a vacío se realizó durante 12 horas un periodo superior con el uso de una bomba de vacío. Por lo tanto, se obtuvieron presomas catiónicos.

Una solución de presomas catiónicos usados en el experimento se preparó por adición de una solución de sacarosa al 9 % (pH 7,4) a los presomas catiónicos obtenidos con el método que se ha descrito anteriormente, con el fin de ajustar la concentración del lípido final a 100 mM, y agitando la mezcla de forma vigorosa durante 10 minutos. El tamaño de partícula promedio de los presomas catiónicos fue aproximadamente 440 ± 210 nm (media ± desviación típica).

Preparación de lipoplejo y preplejo

Los lipoplejos y preplejos se prepararon usando los liposomas catiónicos y se han descrito en el Ejemplo 3 y los presomas catiónicos que se han descrito anteriormente, respectivamente. El ARNsh de Luc que se dirige a luciferasa que se ha descrito en el Ejemplo 3 estaba equipado con los lipoplejos y los preplejos.

Los liposomas catiónicos o presomas catiónicos se mezclaron con los ARNsh de Luc a una proporción de 1600:1 o 800:1 en moles, y los resultantes se agitaron vigorosamente durante 10 minutos. Por lo tanto, se prepararon los lipoplejos y los preplejos con ARNsh de Luc unido a su superficie de membrana externa.

Transfección en células HT-1080

Como reactivo de transfección, se usó Lipofectamina™ 2000 (en lo sucesivo en el presente documento denominada "Lf2000"), que es un liposoma catiónico. Como plásmidos que expresan luciferasa obtenidos a partir de luciérnaga firefly y obtenidos a partir de babosa marina, se usaron pGL3-C and pRL-TK (Promega).

Los plásmidos que expresan luciferasa obtenidos a partir de luciérnaga y obtenidos a partir de babosa marina (15 µg + 15 µg) y 30 µl de Lf2000 se diluyeron por separado con OptiMEM para preparar 750 µl de las soluciones de los mismos, las soluciones resultantes se mezclaron, la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente de 10 a 20 minutos para formar un lipoplejo de Luc.

Una suspensión de células de fibrosarcoma humano (HT-1080) (10.000 células/ml) se pipeteó en una placa de 12 pocillos, la solución del cultivo se retiró de la misma 24 horas a partir de ese momento, se añadieron 100 µl a esto de

la solución de lipoplejo de Luc, y a continuación el cultivo se realizó a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante 5 horas.

5 A partir de ese momento, la solución de cultivo se retiró, la placa se lavó con PBS(-) frío una vez, se añadieron 100 µl de una solución de un lipoplejo con ARNsh de Luc unido a su superficie de membrana externa o una solución de un preplejo con ARNsh de Luc unido a su superficie de membrana externa (la concentración final de ARNsh en cada pocillo era 50 nM) en combinación con 900 µl de un medio DMEM recién preparado, y a continuación el cultivo se realizó a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante un periodo adicional 48 horas.

10 Ensayo de actividad de luciferasa

El ensayo de actividad de luciferasa se realizó con el uso del Sistema de Ensayo de Indicador de Luciferasa Doble (Promega) y una microplaca de 96 pocillos. El cultivo se realizó durante 48 horas, el medio se retiró, la placa se lavó con PBS(-) frío una vez, y se añadieron 105 µl de tampón de lisis pasivo directamente a los pocillos para lisis celular. 15 La congelación-descongelación se realizó una vez, la centrifugación se realizó a 10.000x g y 4 °C durante 30 segundos, y el sobrenadante resultante se usó como un extracto celular.

El Reactivo II de Ensayo de Luciferasa (50 µl) y 10 µl del extracto celular se añadieron a cada pocillo, y el nivel de bioluminescencia se sometió a ensayo basándose en la actividad de luciferasa luciérnaga con el uso de un lector de microplacas (Infinite 200® Pro, Tecan). A partir de ese momento, se añadieron adicionalmente 50 µl del Reactivo Stop & Glo®, y la actividad de luciferasa de babosa marina se sometió al ensayo del mismo modo. 20

La actividad de luciferasa obtenida a partir de luciérnaga se determinó de acuerdo con la fórmula que se muestra a continuación, con respecto a la actividad sin tratamiento de ARNsh de Luc. 25

Actividad relativa de luciferasa obtenida a partir de luciérnaga (%) = (actividad de luciferasa de luciérnaga/actividad de luciferasa de babosa marina)/(actividad de luciferasa luciérnaga sin tratamiento de ARNsh de Luc/actividad de luciferasa de babosa marina sin tratamiento de ARNsh de Luc) x 100.

30 Los resultados se muestran en la Fig. 10.

Como se muestra en la Fig. 10, la expresión de luciferasa se inhibió de forma más eficaz con un preplejo con ARNsh de Luc unido a su superficie de membrana externa, en comparación con un lipoplejo que tenía ARNsh de Luc unido a su superficie de membrana externa. Si el complejo contenía DOPC o POPC no era significativo. Además, un preplejo que contenía DOPC presentaba en cierto modo una eficacia más elevada para inhibición de la expresión que un preplejo que contenía POPC en el grupo al que se había administrado el preplejo. 35

[Ejemplo 11]

40 Efectos inhibitorios del crecimiento tumoral conseguidos por administración intratorácica de lipoplejo y preplejo cada uno con ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa en modelos de implante ortotópica de mesotelioma pleural maligno

45 Establecimiento de modelos de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno

Los modelos de implante ortotópico de mesotelioma pleural maligno usando las células MSTO-211H-Luc se prepararon con el método que se ha descrito en el Ejemplo 4, y los ratones 4 días después del implante se sometieron al experimento *in vivo*.

50 Preparación de lipoplejo y preplejo cada uno con ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa

De acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 10, se prepararon liposomas catiónicos y presomas catiónicos con la composición del lípido de DOPE:DOPC:DC-6-14 de 3:2:5. El liposomas y los presomas se mezclaron con ARNsh de dirección a TS que se ha descrito en el Ejemplo 1 para preparar un lipoplejo (un lipoplejo de TS) y un preplejo (un preplejo de TS). La proporción de los liposomas o presomas con respecto a los ARNsh fue 2000:1 en moles. El tamaño de partícula promedio del liposoma de TS y el del preplejo de TS preparado fueron aproximadamente 210 ± 100 nm y aproximadamente 630 ± 400 nm (media ± desviación estándar), respectivamente. Evaluación de los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral en el preplejo y el lipoplejo cada uno con ARNsh de TS unido a su superficie de membrana externa. 55

60 El lipoplejo de TS o preplejo de TS se administró directamente en la cavidad torácica, 4, 7, 10, 13, y 16 días después del implante tumoral, de modo que pudieran administrar 20 µg (50 µl) de ARNsh.

65 Cuando un agente quimioterapéutico existente (Alimta; pemetrexed sódico hidratado (PMX), Eli Lilly) se usó en combinación, una dosis de 25 mg/kg se administró por vía intraperitoneal cada día de 4 días a 8 días después del

implante del tumor, la misma cantidad del agente se administró por vía intraperitoneal después de un intervalo de 2 días cada día de 11 días a 15 días después del implante del tumor, y la administración se realizó 10 veces en total.

5 Dos días después de la administración final del lipoplejo de TS o preplejo de TS (es decir, 18 días después del implante del tumor), 100 µl de una solución de sal potásica de D-luciferina (7,5 mg/ml) se administró por vía intraperitoneal con anestesia con isoflurano, y los niveles de bioluminescencia dependiendo de la actividad de luciferasa en las células MSTO-211H-Luc que se habían cultivado en la cavidad torácica se evaluaron usando IVIS (Xenogen, Alameda, CA, U.S.A.).

10 Los resultados se muestran en la Fig. 11.

15 Los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral observados en el grupo sometido a tratamiento con PMX solo eran insignificantes, en comparación con el grupo de control sin tratamiento. En el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de TS o el preplejo de TS solos, por el contrario, los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral eran aparentemente más elevados, en comparación con el grupo de control y el grupo sometido a tratamiento con PMX solo. Aunque los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral más elevados se observaron en el grupo sometido a tratamiento con el lipoplejo de TS o preplejo de TS en combinación con PMX, no se observaron diferencias significativas entre los efectos alcanzados con el lipoplejo y los efectos alcanzados con el preplejo.

20 La Fig. 12 muestra los resultados de medición de pesos corporales de ratones cuando se someten a la evaluación a través de IVIS, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún grupo. Esto indica que el método de administración usado en el presente documento no tiene una toxicidad grave.

Aplicabilidad Industrial

25 La administración tópica del liposoma de acuerdo con la presente invención que tiene un principio activo en el mismo permite una administración eficaz de un principio activo a células limitadas en el sitio diana de administración y/o las proximidades del mismo. Además, la administración tópica del liposoma de acuerdo con la presente invención que tiene, como un principio activo, una molécula de ARNi capaz de inhibir el crecimiento tumoral con respecto al tumor
30 y/o una zona en las proximidades del mismo permite una administración eficaz de una molécula de ARNi a la célula tumoral diana. Por lo tanto, el crecimiento tumoral se puede inhibir de forma eficaz. Se espera que la presente invención produzca una contribución significativa en el campo de la administración farmacológica o tratamiento para el cáncer.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Delta-Fly Pharma, Inc.

<120> Un Liposoma para Administración Local y Uso del Mismo

40 <130> PH-5638-PCT

<150> JP 2013-095950

45 <151> 30.04.2013

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.4

50 <210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

55 <220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 1

60 .guaacaccau .cgaucauga

19

<210> 2

	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 2	
	ucaugaucga ugguguuac	19
10	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 3	
20	gaauacagag auauggaau	19
	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> ARN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
30	<400> 4	
	auuccauauc ucuguauuc	19
	<210> 5	
	<211> 19	
35	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
40	<400> 5	
	cgaucaugau guagagugu	19
	<210> 6	
45	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 6	
	acacucuaca ucaugaucg	19
55	<210> 7	
	<211> 15	
	<212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 7	
	uagugcúccu gguug	15
	<210> 8	
10	<211> 55	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
	guaacacc <u>au</u> cgaucaug <u>au</u> agugcucc <u>ug</u> guugucauga ucgaugg <u>ugu</u> uac <u>uu</u>	55
20	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<220> misc_ARN	
30	<223> (1)..(19)	
	<400> 9	
	ggguguuuug gaggaguugt t	21
	<210> 10	
35	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 10	
	aacaacuccu ccaaaacacc c	21
45	<210> 11	
	<211> 55	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
55	ucuu <u>aa</u> ucgc gu <u>aa</u> aaggcu agugcucc <u>ug</u> guuggcc <u>uu</u> a uacgcg <u>au</u> ua ag <u>au</u>	55
	<210> 12	
	<211> 55	
	<212> ARN	

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

5

<400> 12

cuuacgcuga guacuucgau agugcuccug guugucgaag uacucagcgu aaguu

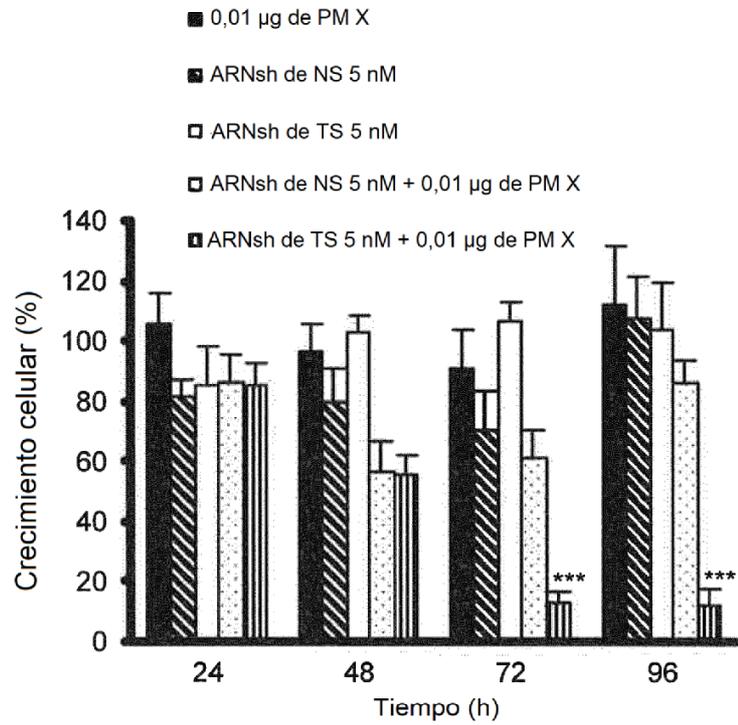
55

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma para uso mediante administración tópica en un método de tratamiento médico, que consiste en dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina y lípido catiónico,
5 en el que la fosfatidilcolina comprende al menos una cadena de ácido graso insaturado que contiene un doble enlace de carbono a carbono, y
en el que el lípido catiónico es cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina (DC-6-14).
2. El liposoma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fosfatidilcolina comprende al menos una
10 cadena de ácido graso insaturado que contiene un doble enlace de carbono a carbono en forma cis.
3. El liposoma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fosfatidilcolina es 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), palmitoil-oleoil fosfatidilcolina (POPC) o 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC).
- 15 4. El liposoma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fosfatidilcolina es DOPC.
5. El liposoma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en DOPE, DOPC y DC-6-14, que consiste opcionalmente en DOPE, DOPC y DC-6-14 a 3:2:5 en moles.
- 20 6. Una composición para uso mediante administración tópica en un método de tratamiento médico que comprende el liposoma para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un compuesto activo.
7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el compuesto activo es un ácido nucleico.
- 25 8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el ácido nucleico está unido a la superficie de la membrana externa del liposoma.
9. Un agente antitumoral para uso mediante administración tópica en un método de tratamiento de un tumor, que comprende el liposoma para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y ARN ahorquillado
30 corto (ARNsh) capaz de inhibir la expresión de la timidilato sintasa a través de ARNi.
10. El agente antitumoral para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el ARNsh está unido a la superficie de la membrana externa del liposoma.
- 35 11. El agente antitumoral para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el ARNsh consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 8.
12. El agente antitumoral para uso de acuerdo con la reivindicación 9, que es para uso en combinación con
40 quimioterapia para el cáncer o un agente quimioterapéutico para cáncer.
13. Un producto combinado que comprende el agente antitumoral para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y un agente quimioterapéutico para cáncer.
- 45 14. El producto combinado de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el agente quimioterapéutico para el cáncer es un agente antitumoral que tiene acción inhibitoria de TS (timidilato sintasa).
15. El producto combinado de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el agente antitumoral que tiene acción inhibitoria de TS es un agente antitumoral 5-FU o pemetrexed sódico hidratado.

Fig. 1

(A)



(B)

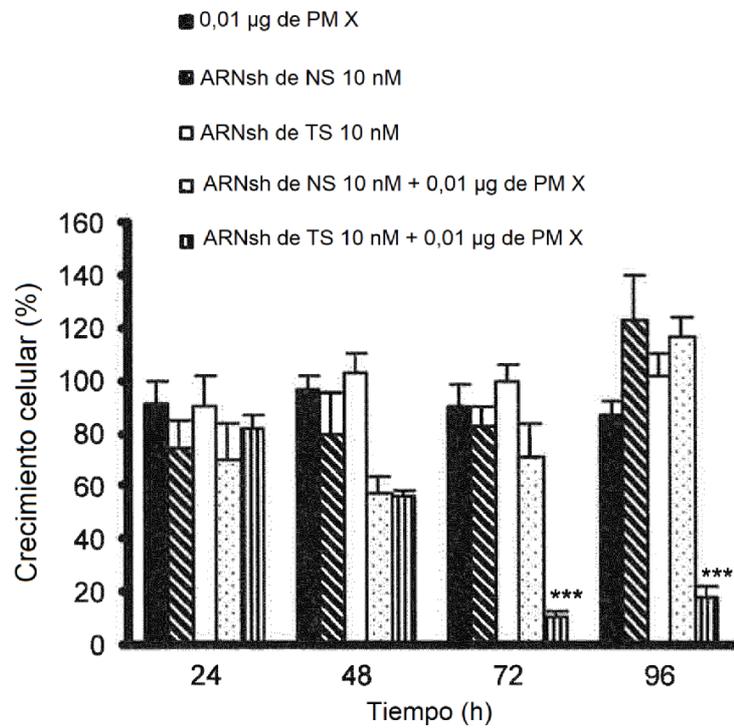
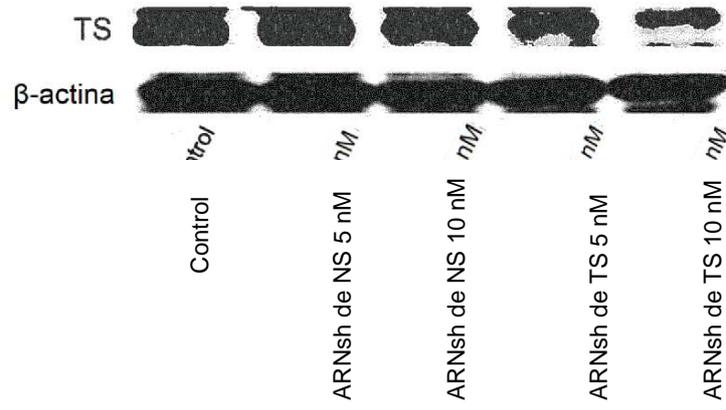


Fig. 2

(A)



(B)

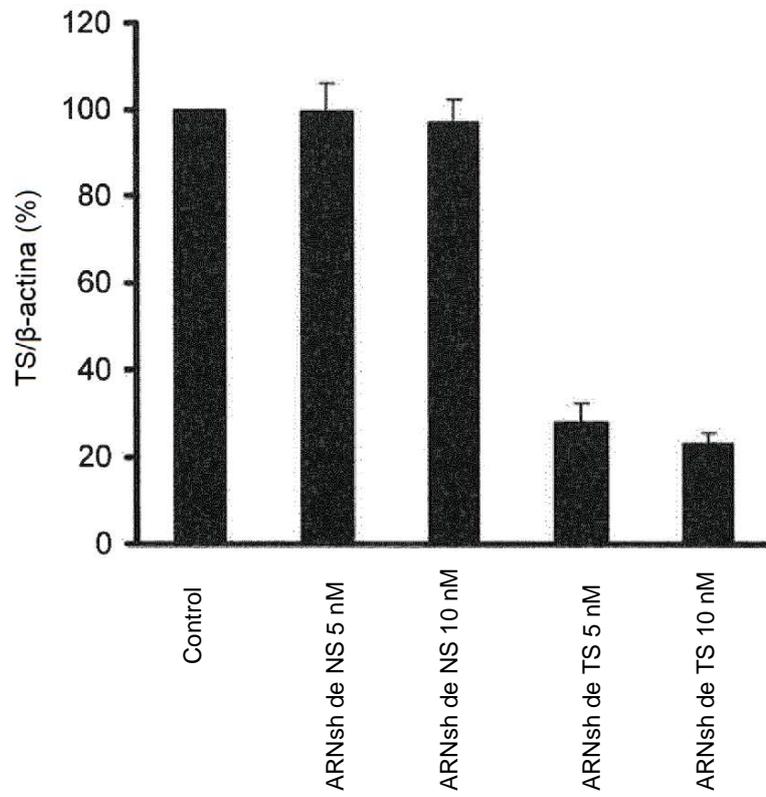


Fig. 3

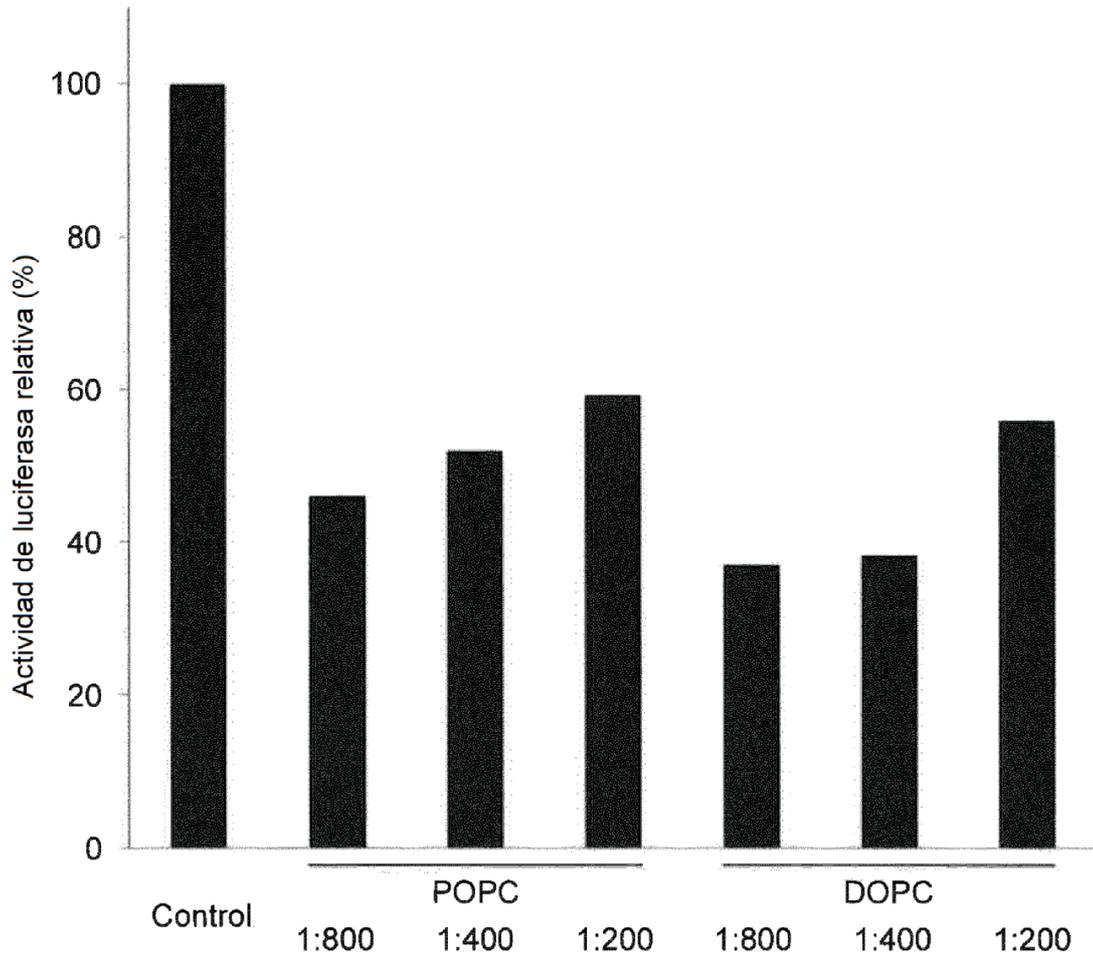


Fig. 4

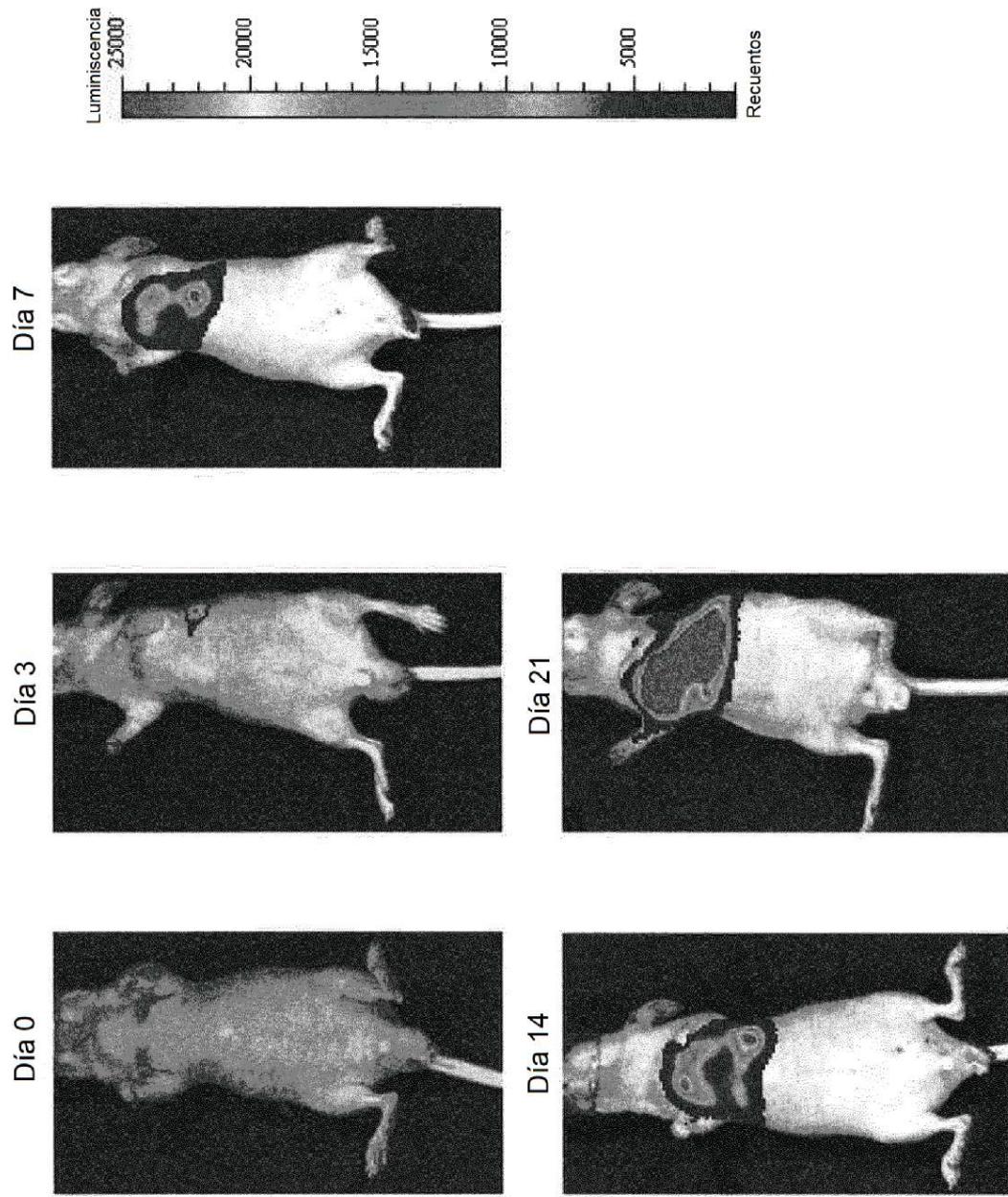


Fig. 5-1

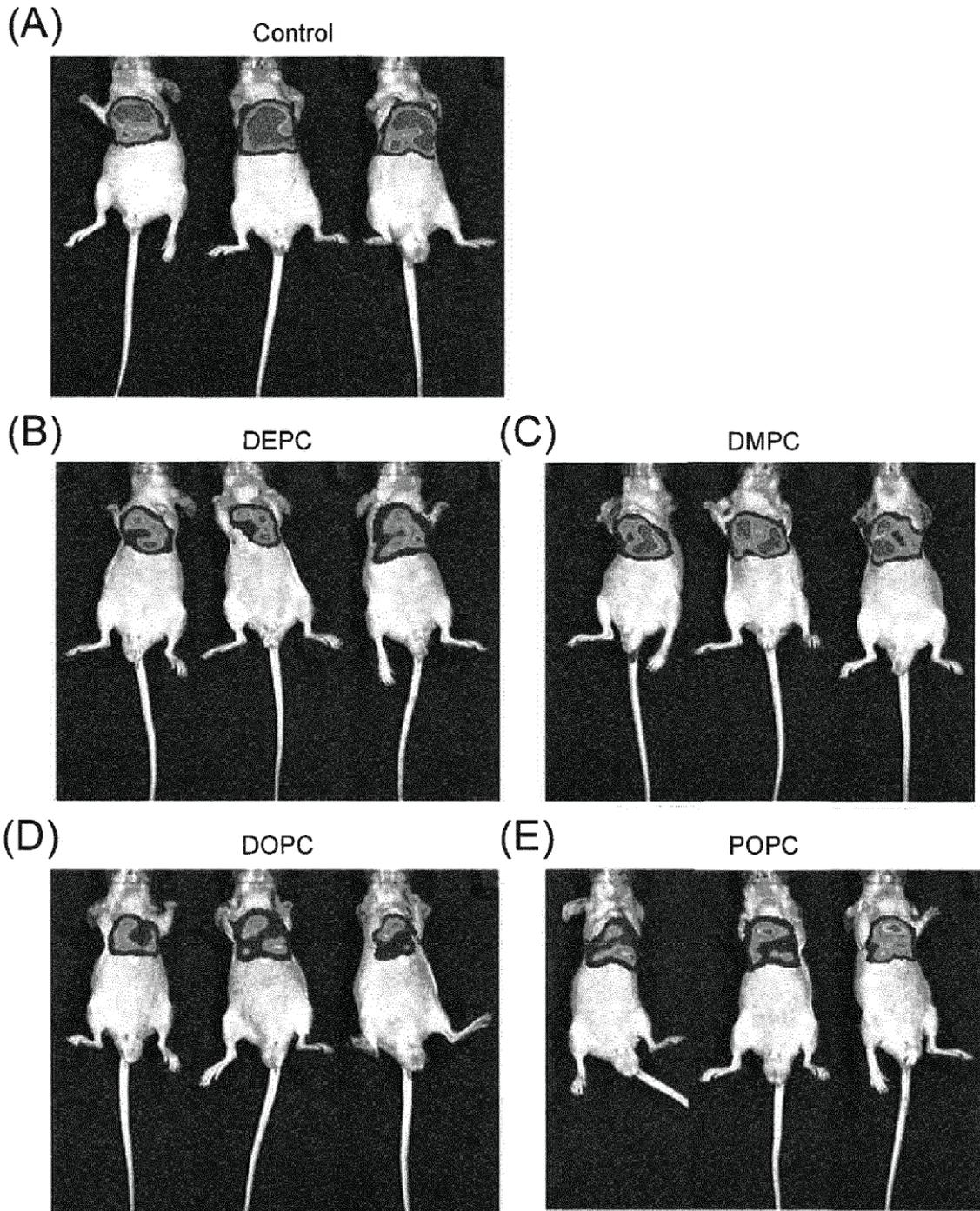


Fig. 5-2

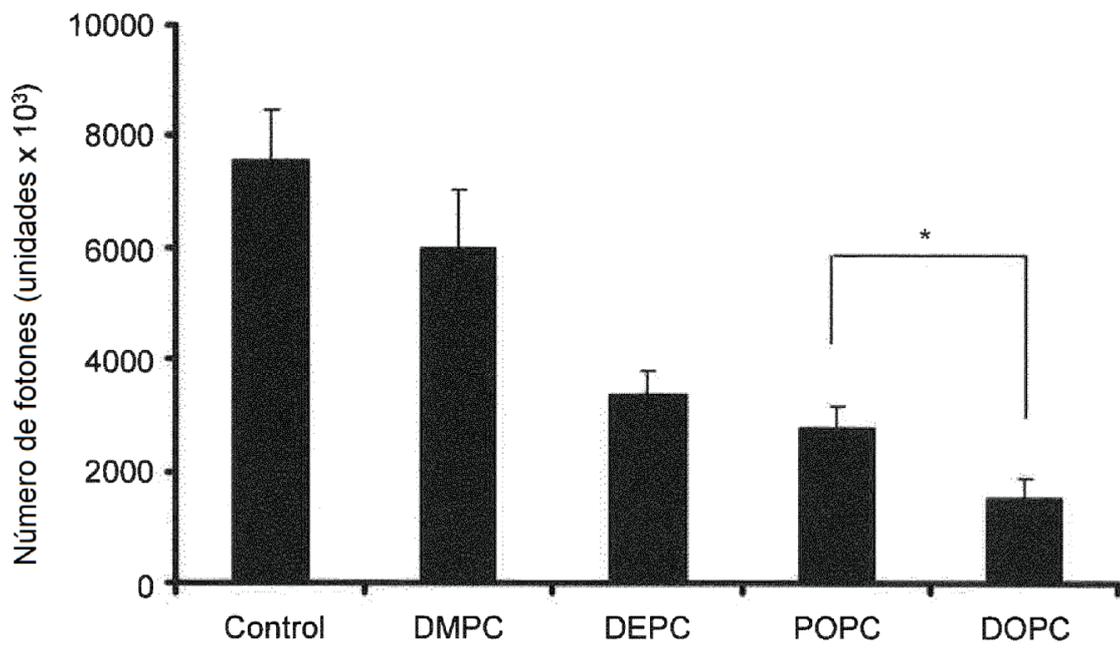


Fig. 6-1

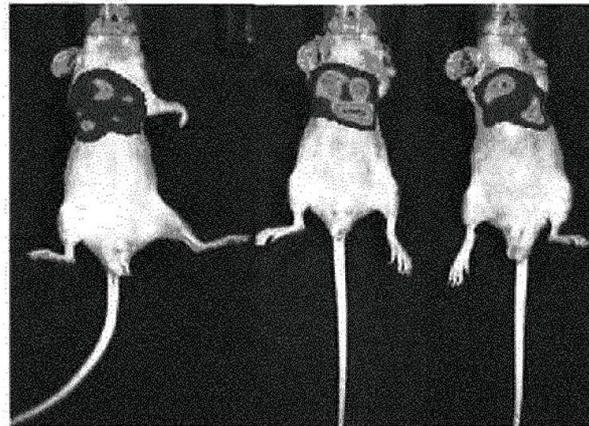
(A)

DC-6-14 al 20 %



(B)

DC-6-14 al 35 %



(C)

DC-6-14 al 50 %



Fig. 6-2

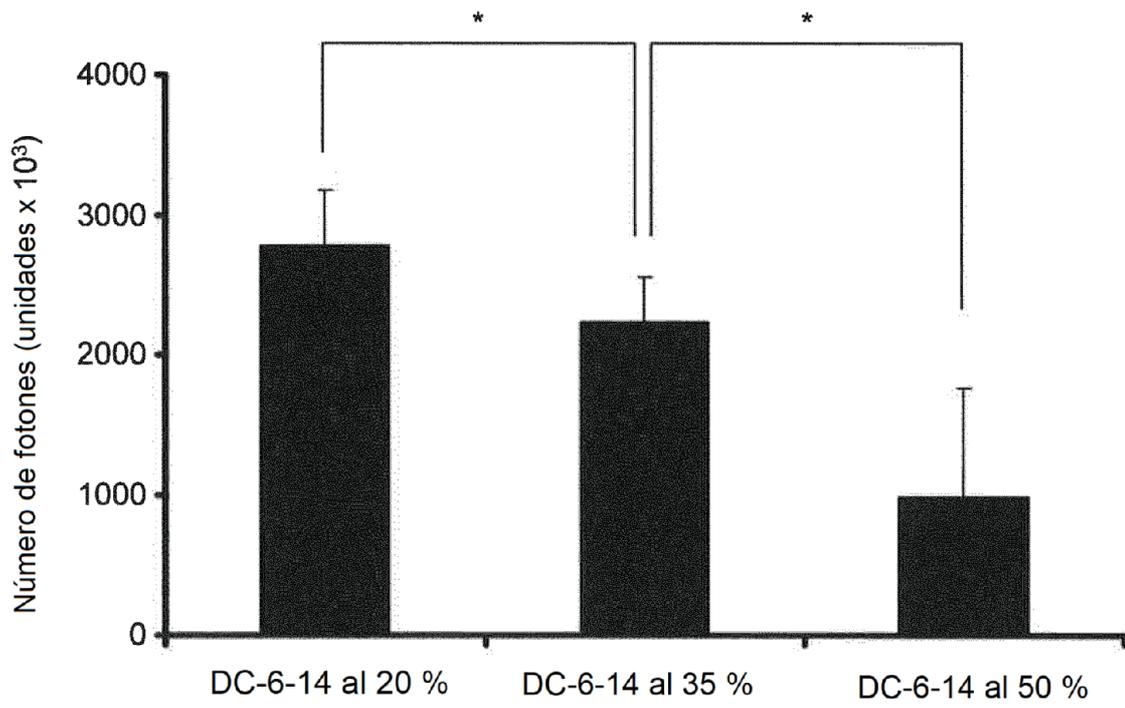


Fig. 7-1

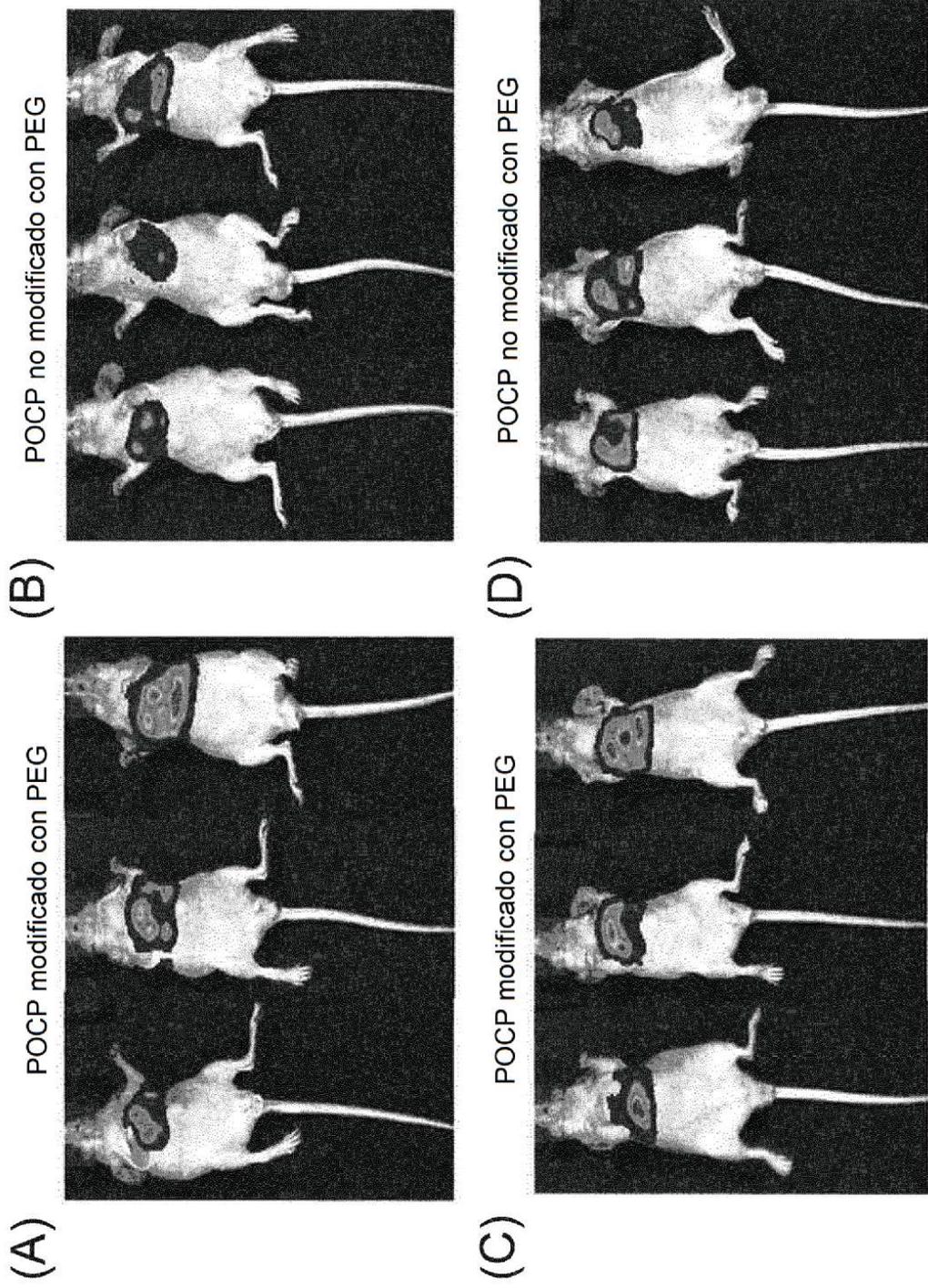
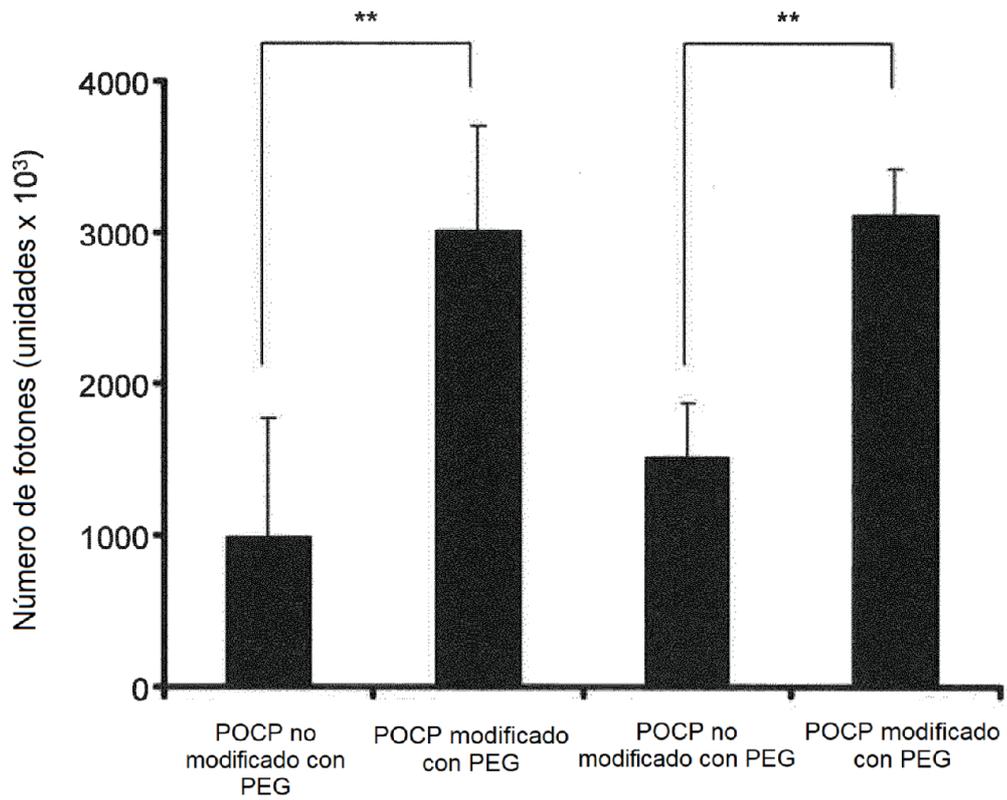


Fig. 7-2



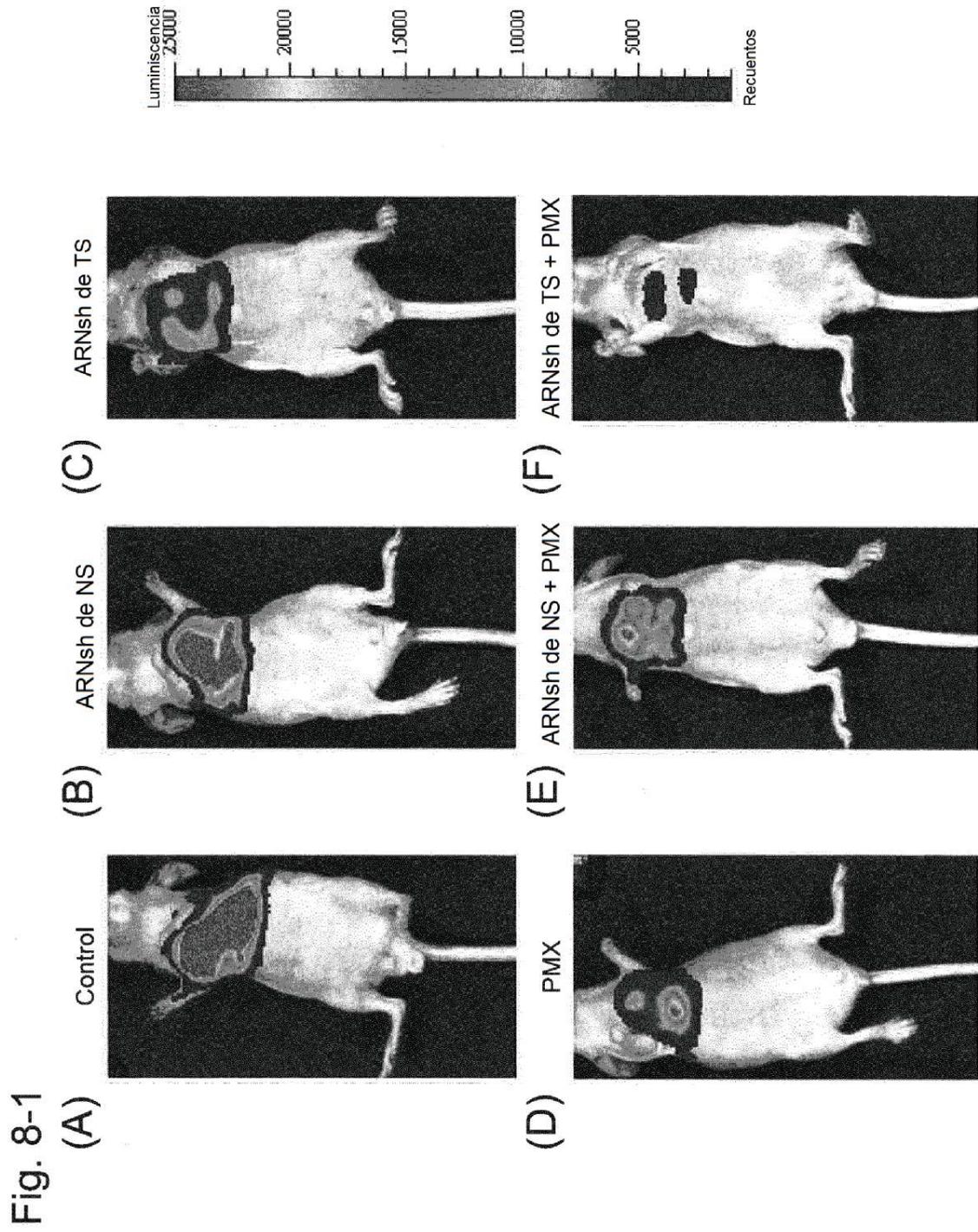


Fig. 8-2

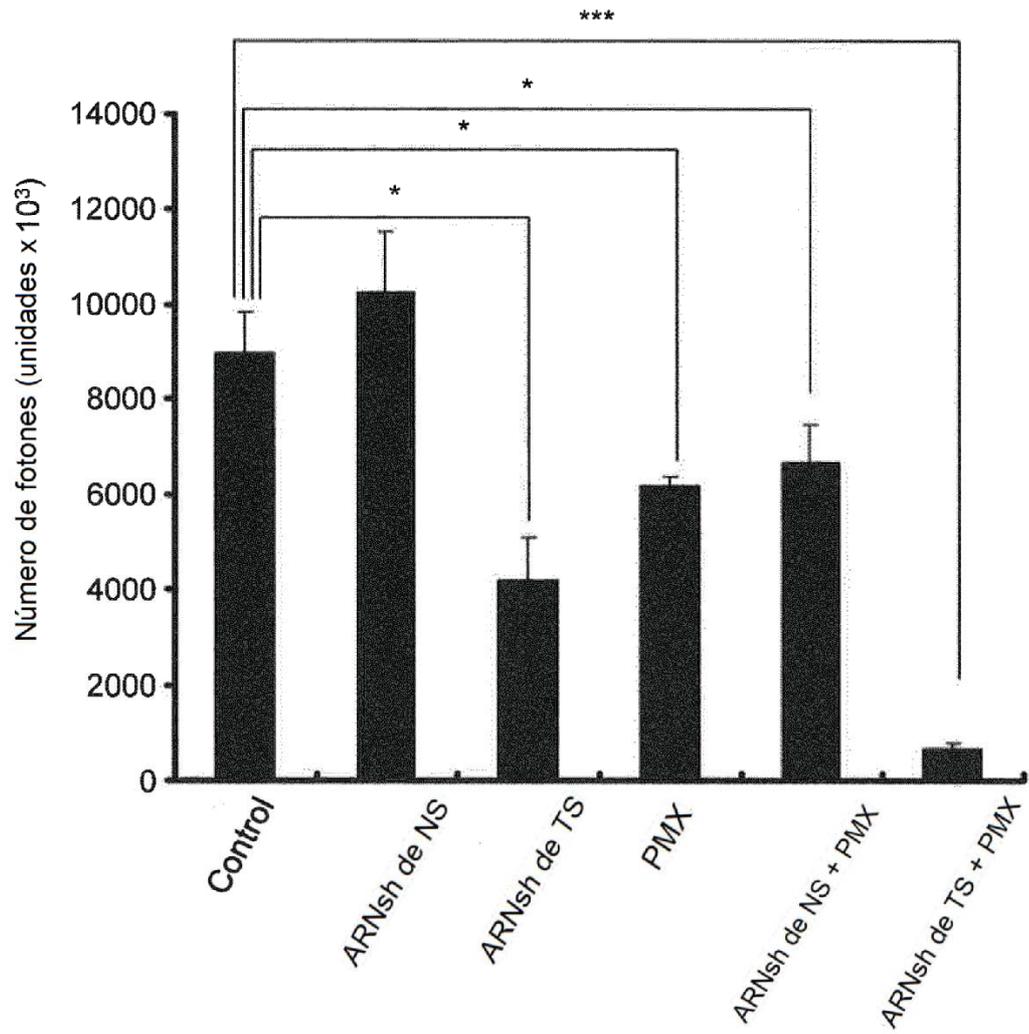


Fig. 8-3

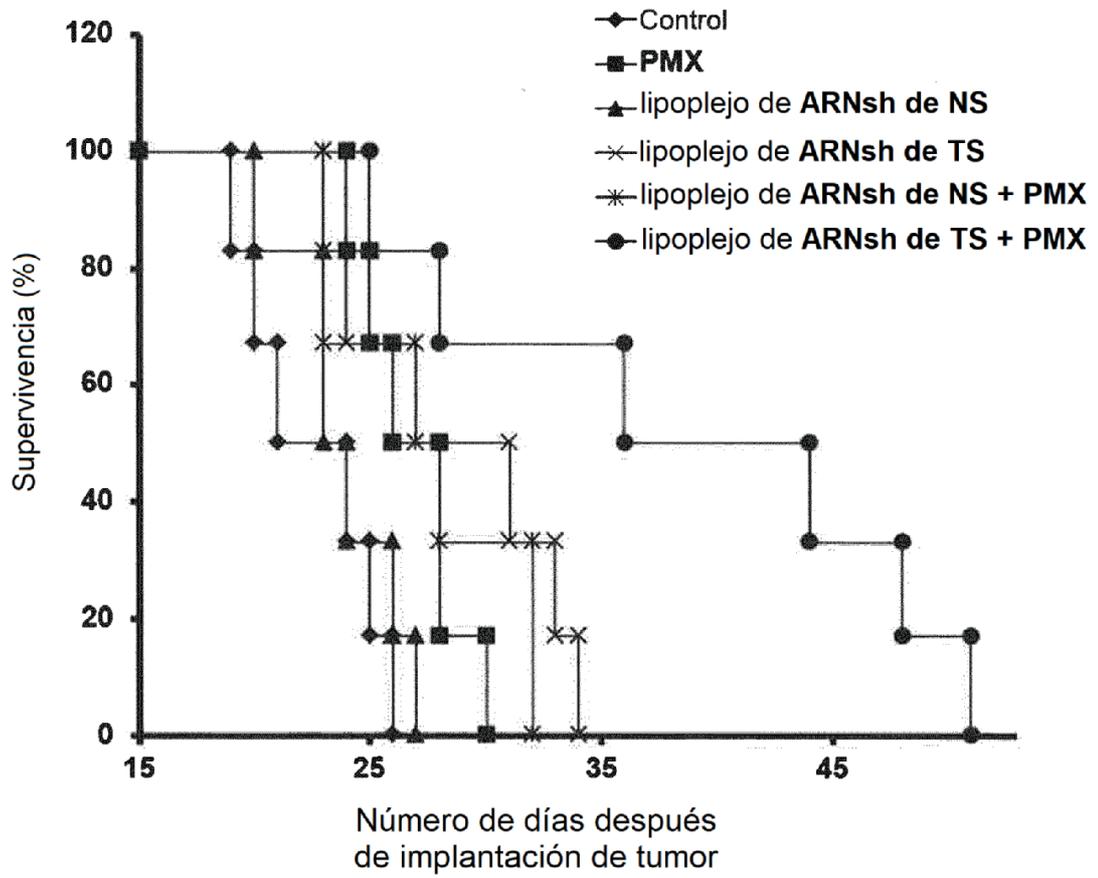


Fig. 8-4

Tratamiento	MST (días)	ILS (%)
Control (9 % de sacarosa)	22,5	-
lipoplejo de ARNsh de NS	24,0	106,6%
lipoplejo de ARNsh de TS	28,5	126,6%
PMX	27,0	120,0%
lipoplejo de ARNsh de NS + PMX	27,5	122,2%
lipoplejo de ARNsh de TS + PMX	40	177,8%

Fig. 9

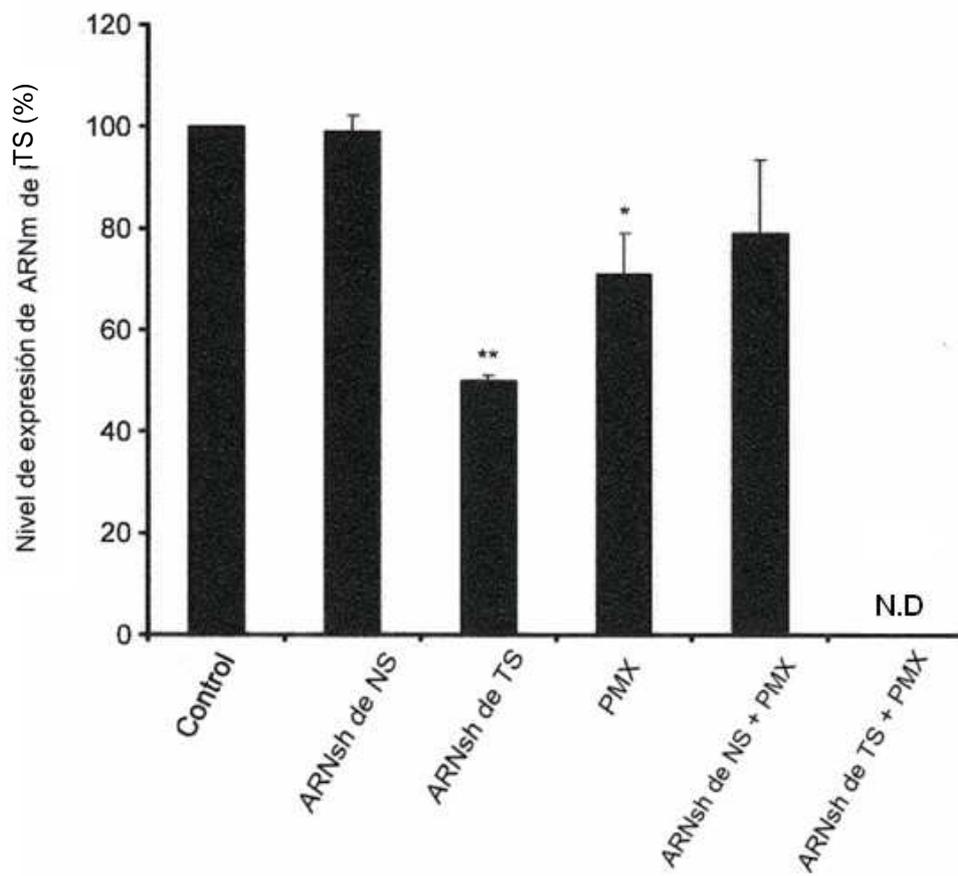
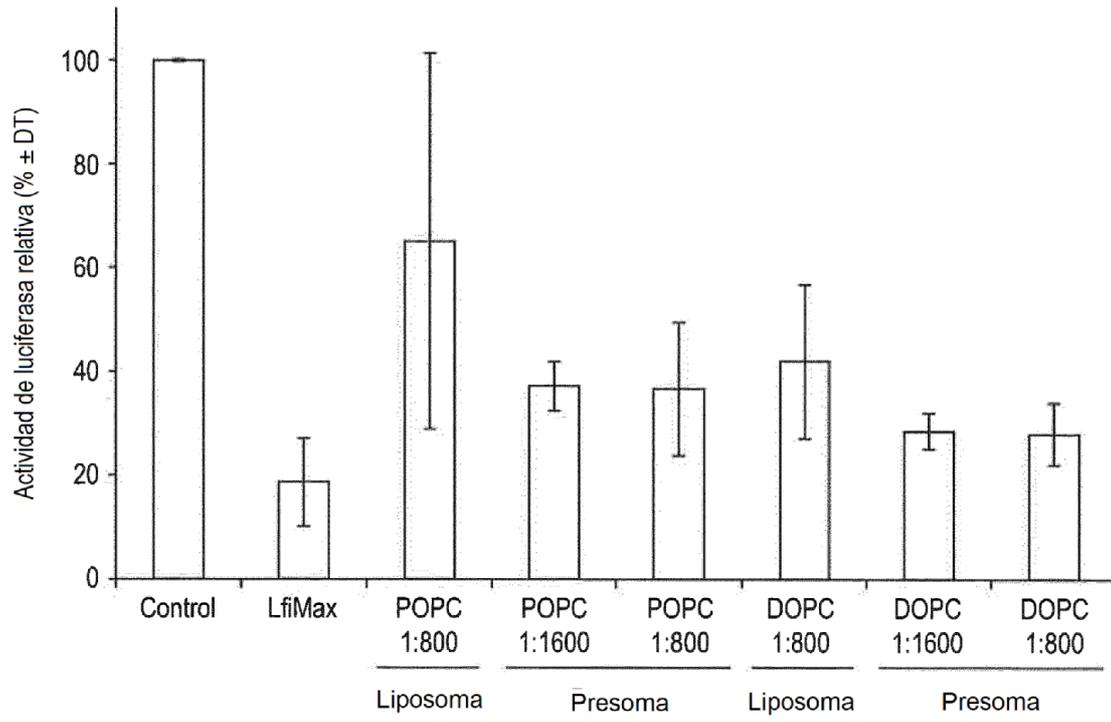


Fig. 10



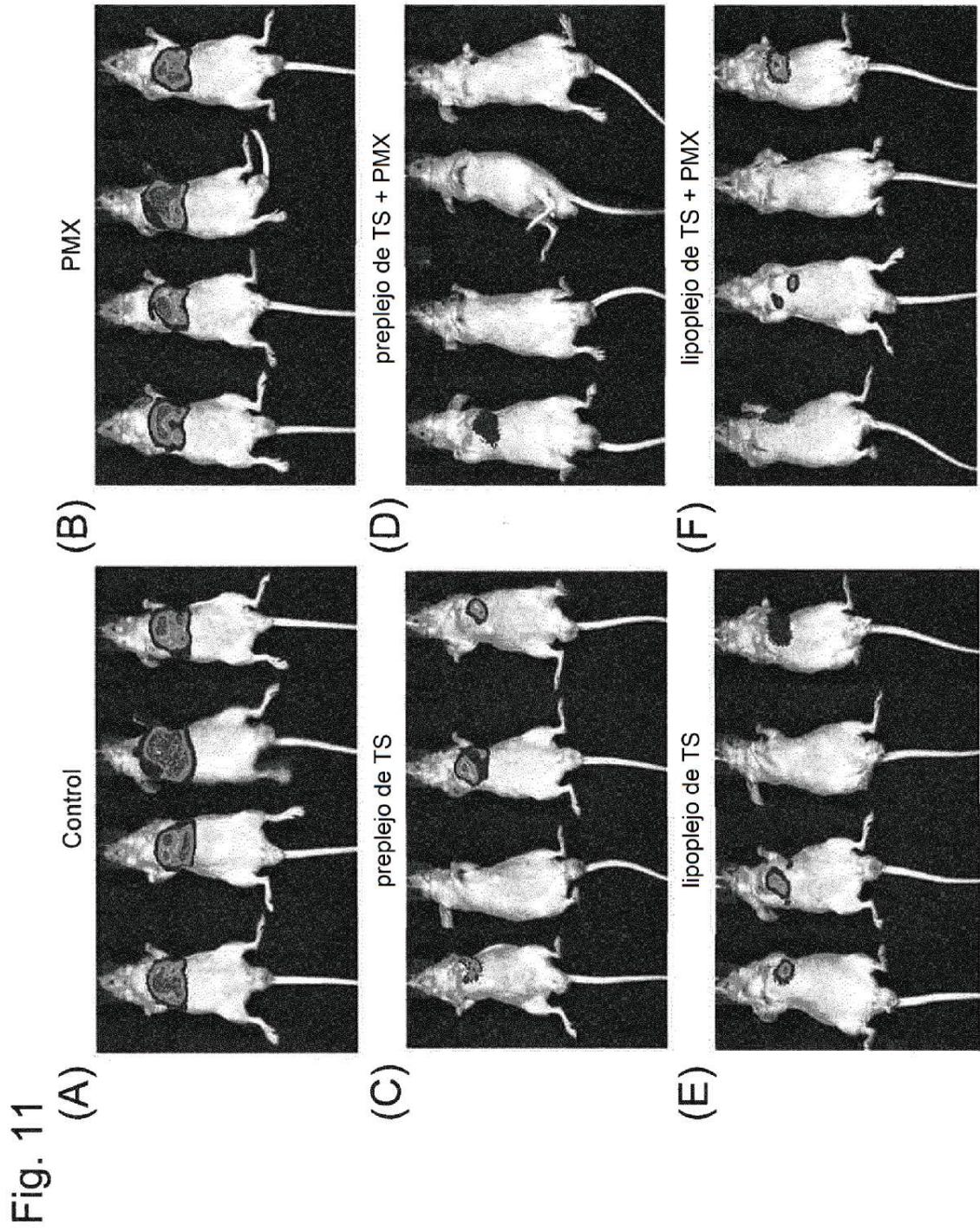


Fig. 12

