



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 343 193**

(51) Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05806794 .3**

(96) Fecha de presentación : **15.11.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1813289**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

(54) Título: **Composición medicinal para tratar el cáncer o la diabetes.**

(30) Prioridad: **19.11.2004 JP 2004-335774**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2010

(73) Titular/es: **Ken Miyagi**
8-1, Hon-cho 3-chome
Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8570, JP

(72) Inventor/es: **Miyagi, Taeko;**
Wada, Tadashi y
Yamaguchi, Kazunori

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 343 193 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

Composición medicinal para tratar el cáncer o la diabetes.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar el cáncer o la diabetes.

Técnica precedente

10 Los inventores de la presente solicitud han aislado satisfactoriamente un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) (véase el Documento de Patente 1). Mientras tanto, descubrieron que la expresión del gen está potenciada en diversos cánceres humanos incluyendo el cáncer de colon (véase el Documento No de Patente 1), el cáncer de próstata, el cáncer de cabeza y cuello, etc., con pocas excepciones. Por otra parte, se encontró
15 que un ratón transgénico en el que se introducía el gen desarrollaba diabetes (véase el Documento No de Patente 2), y se descubrió y se encontró que el polimorfismo en el gen NEU3 en pacientes con diabetes estaba profundamente implicado en el comienzo de la diabetes Tipo 2.

Según se describe anteriormente, se ha sugerido que la potenciación del nivel de expresión de sialidasa humana
20 asociada con la membrana plasmática está profundamente implicada en la canceración de células y el comienzo de la diabetes. Basándose en este hallazgo, los inventores de la presente invención han proporcionado un método para diagnosticar el cáncer usando un anticuerpo que reconoce específicamente una sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (véase el Documento de Patente 2).

25 Por otra parte, en los últimos años, como un método para inhibir específicamente la expresión de un gen particular, ha atraído la atención un método que usa interferencia de RNA (RNAi) provocada por un RNA de doble hebra que tiene una secuencia complementaria del gen. El mecanismo del método se considera como sigue.

30 Cuando un RNA de doble hebra que tiene una secuencia complementaria de un gen elegido para la inhibición de la expresión se incorpora en las células, el RNA de doble hebra se escinde con enzima de Dicer que pertenece a la familia III de RNAasas y se procesa en fragmentos cortos de RNA de doble hebra de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos. Las hebras antisentido de los fragmentos de RNA se unen separadamente a proteínas que tienen actividades de ribonucleasa para formar complejos denominados RISC (complejo silenciador inducido por RNA). Se considera que cuando una hebra antisentido en el RISC se une a mRNA de un gen diana, el mRNA se escinde para
35 inhibir la expresión del gen diana (véase el Documento No de Patente 3).

Se sabe generalmente que, cuando se usa RNA de doble hebra de cadena larga (de al menos cientos de nucleótidos) para inhibir la expresión de un gen de un nematodo, un hongo, *Drosophila*, una planta, o similares, puede alcanzarse un efecto superior de inhibición de la expresión. Sin embargo, en un sistema celular de mamífero, la introducción de un
40 RNA de doble hebra de cadena larga activa una ruta de señal de interferón para provocar citotoxicidad, así se considera que el método es difícil de aplicar a células de mamífero. Sin embargo, posteriormente, se ha desarrollado un método para evitar respuestas de interferón introduciendo un RNA de doble hebra corto (por ejemplo, de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos) por adelantado, y se ha hecho aplicable a células de mamífero (véase el Documento No de Patente 4). Tal RNA de doble hebra corto se denomina siRNA (RNA interferente pequeño) y se espera que se aplique a un
45 análisis de la función génica o una terapia génica que usa virus (por ejemplo, véase el Documento No de Patente 5). Sin embargo, no se ha conocido un siRNA que inhibe la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y no se ha conocido una composición farmacéutica para tratar el cáncer o la diabetes usando tal siRNA.

50 Documento de Patente 1: JP 3088681 B

Documento de Patente 2: JP 2003-55399 A

Documento No de Patente 1: Proc. Natl. Acad. Sci., 99, 10718-10723, 2002

55 Documento No de Patente 2: J. Biol. Chem., 278, 27896-27902, 2003

Documento No de Patente 3: Molecular Medicine, 41(1), 10-29, 2004

60 Documento No de Patente 4: Nature, 411, 494-498, 2001

Documento No de Patente 5: Virus, 53(1), p7-14, 2003

Divulgación de la invención

65 La presente invención se ha realizado desde el punto de vista descrito anteriormente, y un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar el cáncer o la diabetes que contiene un siRNA que inhibe eficazmente la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3).

Los inventores de la presente invención han realizado estudios intensivos para alcanzar el objetivo descrito anteriormente y, como resultado, han descubierto que un siRNA que tiene una secuencia particular inhibe eficazmente la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), completando de ese modo la presente invención.

Esto es, el resumen de la presente invención es como sigue.

(1) Una composición farmacéutica para tratar el cáncer o la diabetes, que comprende un RNA de doble hebra mostrado en (A) o (B):

(A) un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8;

(B) un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 o el N° ID SEC: 4, o un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 25 a 30 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 8, y el RNA de doble hebra inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3).

También se describe una composición farmacéutica de acuerdo con (1), en la que el RNA de doble hebra tiene de 20 a 27 nucleótidos.

(2) La composición farmacéutica de acuerdo con (1), en la que el RNA de doble hebra comprende además un extremo saliente 3' de 1 a 4 nucleótidos.

(3) La composición farmacéutica para tratar el cáncer o la diabetes, que comprende un vector que tiene una secuencia de nucleótidos capaz de expresar el RNA de doble hebra de acuerdo con (1) o (2) en células humanas.

(4) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), en donde el cáncer o la diabetes provoca un incremento en la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3).

Descripción de las realizaciones preferidas

Posteriormente, en la presente memoria, se describirán con detalle realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada a las siguientes realizaciones preferidas y puede modificarse libremente dentro del alcance de la presente invención. Nótese que, en la presente descripción, porcentaje indica en masa a no ser que se especifique otra cosa.

Una composición farmacéutica para tratar el cáncer o la diabetes de la presente invención (posteriormente, en la presente memoria, denominada a veces meramente "la composición farmacéutica de la presente invención") comprende el siguiente RNA de doble hebra (A) o (B):

(A) un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8.

(B) un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 o el N° ID SEC: 4; o un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 25 a 30 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 8, y el RNA de doble hebra inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3).

El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención es un siRNA según se describe anteriormente e inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3). La secuencia del gen se conoce y divulga como el N° de registro de GenBank/DBJ AB008185 (JP 3088681 B).

El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención incluye: (A) un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8; o (B) un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 o un N° ID SEC: 4; o un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 25 a 30 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática

(NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 8, y el RNA de doble hebra inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3).

En la presente memoria, el “RNA de doble hebra que consiste en una secuencia idéntica a” una secuencia parcial de un gen significa una doble hebra que comprende un RNA o DNA que tiene una secuencia idéntica a una secuencia parcial del gen (hebra antisentido) y un RNA que tiene una secuencia complementaria de la misma (hebra de sentido). Nótese que un RNA que tiene una secuencia “idéntica a” una secuencia de un DNA significa un RNA que tiene la misma secuencia de nucleótidos que el DNA, excepto que la timina se ha reemplazado por uracilo, mientras que un DNA que tiene una secuencia “idéntica a” una secuencia de un RNA significa un DNA que tiene la misma secuencia de nucleótidos que el RNA, excepto que el uracilo se ha reemplazado por timina.

Mientras tanto, el “un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 19 a 23 ó 25 a 30 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 o el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8” significa: una doble hebra que comprende un RNA o DNA que es idéntico a una hebra antisentido de un gen que codifica NEU3 y tiene una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que comprende el N° ID SEC: 2 o una secuencia idéntica a la misma (hebra antisentido) y un RNA que tiene una secuencia complementaria de la misma (secuencia sentido); una doble hebra que comprende un RNA o DNA que es idéntico a una hebra antisentido de un gen que codifica NEU3 y tiene una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que comprende el N° ID SEC: 4 o una secuencia idéntica a la misma (hebra antisentido) y un RNA que tiene una secuencia complementaria de la misma (hebra sentido); una doble hebra que comprende un RNA o DNA que es idéntico a una hebra antisentido de un gen que codifica NEU3 y tiene una secuencia de 25 a 30 nucleótidos que comprende el N° ID SEC: 8 o una secuencia idéntica a la misma (hebra antisentido) y un RNA que tiene una secuencia complementaria de la misma (hebra sentido). Mientras tanto, el “RNA de doble hebra que consiste en la secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8” significa: una doble hebra que consiste en un RNA o DNA que consiste en una secuencia de 19 nucleótidos representada por el N° ID SEC: 2 o una secuencia idéntica a la misma (hebra antisentido) y un RNA complementario de la misma (hebra sentido); una doble hebra que consiste en un RNA o DNA que consiste en una secuencia de 19 nucleótidos representada por el N° ID SEC: 4 o una secuencia idéntica a la misma (hebra antisentido) y un RNA complementario de la misma (hebra sentido); o una doble hebra que consiste en un RNA o DNA que consiste en una secuencia de 25 nucleótidos representada por el N° ID SEC: 8 o una secuencia idéntica a la misma -5a-(hebra antisentido) y un RNA complementario de la misma (hebra sentido).

El N° ID SEC: 2 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que incluye los nucleótidos 704-722 del N° de registro del Gen-Bank/DDBJ AB008185; el N° ID SEC: 4 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que incluye los nucleótidos 1009-1027 del N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185; y el N° ID SEC: 8 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que incluye los nucleótidos 833-857 del N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185. El término “complementario” o “idéntico” no siempre significa una secuencia completamente complementaria o idéntica y puede incluir una secuencia con una, dos o tres discordancias de nucleótidos con tal de que el mRNA de un gen diana pueda escindirse con un complejo RISC al que se ha incorporado un RNA de doble hebra.

La secuencia de la hebra sentido en un RNA de doble hebra puede ser un RNA o un DNA, pero preferiblemente es un RNA. La inhibición de la expresión de un gen por un híbrido de RNA-DNA se describe en JP 2003-219893 A. En la presente descripción, la secuencia de un RNA de doble hebra se representa como una secuencia de RNA o DNA de la hebra antisentido.

Mientras tanto, la locución “inhibir la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3)”, según se usa en la presente memoria, significa que cuando un RNA de doble hebra de la presente invención se introduce en células humanas, se forma un complejo RISC en el que se ha incorporado la hebra antisentido del RNA de doble hebra y el complejo RISC escinde mRNA de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3). Que se inhiba la expresión del gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) puede confirmarse, por ejemplo: preparando células en las que se introduce un RNA de doble hebra de la presente invención y células en las que no se introduce el RNA bajo la misma condición, excepto por la introducción del DNA de doble hebra de la presente invención; midiendo el nivel de mRNA de toda la longitud del gen, el nivel de proteína de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), que es un producto del gen, el valor de actividad de sialidasa, etc., en ambas células; y confirmando que el nivel de mRNA, el nivel de proteína o la actividad de sialidasa se reducen en las células en las que se introduce el RNA de doble hebra de la presente invención en comparación con aquellas en las que no se introduce el RNA de doble hebra de la presente invención. El nivel de mRNA puede medirse mediante un método conocido tal como el método de transferencia Northern o el método de RT-PCR, según se describe en los Ejemplos posteriores. Mientras tanto, el nivel de proteína puede medirse mediante un método conocido tal como el método de RIA o el método de ELISA. Además, la actividad de sialidasa puede medirse llevando a cabo una prueba usando gangliósido como un sustrato según se describe en los Ejemplos posteriores.

El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención es preferiblemente un RNA de doble hebra que consiste en la secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8. Sin embargo, puede usarse un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 o el N° ID SEC: 4; o un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de

25 a 30 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 8, en donde el RNA de doble hebra inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), con tal de que tenga el efecto de inhibir la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), como es el caso con el RNA de doble hebra descrito anteriormente. En los Ejemplos siguientes, se ha confirmado que un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8 tiene el efecto de inhibir la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), pero puede usarse un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 o el N° ID SEC: 4; o un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 25 a 30 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 8, en donde el RNA de doble hebra inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), con tal de que tenga el efecto de inhibir la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) como es el caso con el RNA de doble hebra descrito anteriormente. Se ha presentado que los RNA de doble hebra de como mucho aproximadamente 27 nucleótidos tienen casi las mismas actividades en algunos casos (véase J. Biol. Chem., 278, 15991-15997, 2003) y, también en los Ejemplos posteriores, se confirma que un RNA de doble hebra que tiene una secuencia de 25 nucleótidos es eficaz. Por lo tanto, se considera que el RNA de doble hebra de aproximadamente 20 a 30 nucleótidos y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8 tiene el mismo efecto.

Un RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención tiene de 19 a 23 nucleótidos, preferiblemente de 19 a 21 nucleótidos, o de 25 a 30 nucleótidos. Los números de los nucleótidos, según se describe en la presente memoria, se refiere a los números de nucleótidos en una porción de doble hebra, y no incluye los números de nucleótidos en los extremos salientes 3' según se describe posteriormente.

Mientras tanto, en un RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención, las secuencias de la hebra sentido y la hebra antisentido pueden tener la misma longitud, pero cualquiera o ambas secuencias pueden tener además un extremo saliente 3' (proyectado) de 1 a 4 nucleótidos. Esto se debe a que el RNA de doble hebra de la presente invención se hace más estable en caso de que el RNA tenga además tal extremo saliente 3'. Mientras tanto, se sabe que tal extremo saliente 3' de 4 nucleótidos o menos no tiene influencia sobre el efecto de inhibición de la expresión de un gen diana (véase Nat. Biotechnol., 20, 497-500, 2002).

El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención puede prepararse, por ejemplo: preparando un RNA de doble hebra que tiene una secuencia idéntica a un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) o una de sus partes; y escindiendo el RNA con enzima de Dicer. Puede usarse enzima de Dicer, que está disponible comercialmente. El RNA de doble hebra puede prepararse mediante una reacción de RNA polimerasa que usa, como una plantilla, un DNA de doble hebra que tiene una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 o el N° ID SEC: 4; o un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 25 a 30 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 8; o una reacción de RNA polimerasa que usa, como una plantilla, un DNA de doble hebra idéntico a la secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8. Tales DNA de doble hebra pueden prepararse mediante amplificación usando cebadores diseñados basándose en la secuencia del gen.

Cuando el RNA de doble hebra obtenido como anteriormente se escinde con enzima de Dicer, puede obtenerse un RNA de doble hebra (siRNA) que ha de usarse en la presente invención. El siRNA así obtenido es una mezcla de diversos tipos de moléculas de RNA incluyendo un siRNA que ha de usarse en la presente invención. El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención (siRNA) puede ser tal mezcla o moléculas de RNA uniformes obtenidas purificando la mezcla.

El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención (siRNA) también puede producirse mediante síntesis química. Esto es, el RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención (siRNA) puede obtenerse: sintetizando una hebra sentido correspondiente a una secuencia diana y una hebra antisentido; y reasociando las hebras. Por otra parte, el RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención (siRNA) puede obtenerse: insertando un DNA sintético diseñado basándose en la secuencia de un gen diana en un vector de expresión de siRNA disponible comercialmente; y expresándolo en un huésped apropiado.

Mientras tanto, una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir un RNA de doble hebra que se convierte en un RNA de doble hebra (siRNA) de interés mediante enzima de Dicer endógena en una célula diana.

Además, en otra realización de la composición farmacéutica de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un vector que tiene una secuencia de nucleótidos que permite que el RNA de doble hebra se exprese en células diana humanas, en vez del propio RNA de doble hebra. Ejemplos del vector incluyen un vector de expresión de siRNA en tándem y un vector de expresión de siRNA tipo horquilla. Tales vectores no están particularmente limitados y pueden estar disponibles comercialmente con tal de que sean capaces de expresar un gen en células humanas.

En el caso del vector de expresión de siRNA en tándem, las hebras sentido y antisentido de un siRNA de interés se transcriben separadamente mediante una RNA polimerasa en una célula, y a continuación ambas hebras se reasocian para generar un siRNA de interés. Por otra parte, en el caso del vector de expresión de siRNA tipo horquilla, un RNA que incluye las hebras sentido y antisentido de un siRNA de interés se transcribe mediante una RNA polimerasa en una célula como una unidad, y a continuación ambas hebras se curvan en una región entre las hebras sentido y antisentido y se reasocian para formar un RNA precursor tipo horquilla (shRNA; RNA tipo horquilla corto), seguido por la retirada de una región de una hebra simple no reasociada con RNAasa en una célula para generar un siRNA de interés en una célula. Métodos específicos de esto se describen en, por ejemplo, JP 2004-261002 A, "RNAi Experiment Protocol, edición revisada, publicada por Yodosya Co., Ltd., publicada el 1 de octubre de 2004", o similares. En la presente memoria descriptiva, el "RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención" puede incluir un RNA de doble hebra (siRNA) producido mediante un RNA que se expresa a partir del vector descrito anteriormente en una célula humana en la que se introduce un vector que tiene una secuencia de nucleótidos, que permite que el RNA de doble hebra de la presente invención descrito anteriormente se exprese en una célula humana.

El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención tiene un efecto de inhibición de la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3). La definición y el método de medida del efecto se describen anteriormente.

El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención tiene además un efecto de inhibición de la proliferación de células cancerosas e inducción de la apoptosis de células cancerosas. El grado de inhibición de la proliferación de células cancerosas puede medirse, por ejemplo, midiendo el número de células, el nivel de DNA total, el nivel de proteína total, etc., o mediante un método tal como un ensayo de MTT. La locución "tiene un efecto de inhibición de la proliferación de células cancerosas", según se usa en la presente memoria, significa que, en el caso en el que las células en las que se introduce el DNA de doble hebra de la presente invención y las células en las que no se introduce el DNA de doble hebra de la presente invención se cultivan bajo las mismas condiciones excepto por la introducción del DNA de doble hebra de la presente invención, el grado de proliferación de células cancerosas es inferior, o el grado de reducción en células cancerosas es superior, en las células en las que se introduce el DNA de doble hebra de la presente invención que en las células en las que no se introduce el DNA de doble hebra de la presente invención.

El grado de inducción de la apoptosis puede medirse mediante un método conocido tal como el método de TUNEL, un ensayo de fragmentación de DNA, el método de análisis de FACS, el método de Annexin o el método de medida de actividad de caspasa. La locución "tiene un efecto de inducción de la apoptosis" significa que, en el caso en el que el grado de apoptosis se mida usando células en las que se introduce el RNA de doble hebra de la presente invención y células en las que no se introduce el RNA de doble hebra de la presente invención bajo las mismas condiciones, excepto por la introducción del RNA de doble hebra de la presente invención, el grado de apoptosis es superior en las células en las que se introduce el RNA de doble hebra de la presente invención que en las células en las que no se introduce el RNA de doble hebra de la presente invención.

El RNA de doble hebra que ha de usarse en la presente invención puede usarse como un ingrediente activo de una composición farmacéutica para tratar el cáncer o la diabetes. La composición farmacéutica inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3).

La introducción del RNA de doble hebra en la composición farmacéutica de la presente invención en células humanas inhibe eficazmente la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), que se sugiere intensivamente que está implicada en el cáncer o la diabetes. Mientras tanto, el RNA de doble hebra en la composición farmacéutica de la presente invención inhibe la expresión del gen, dando como resultado la inhibición de la proliferación de células cancerosas y la inducción de la apoptosis. A partir de estos hechos, se considera que la composición farmacéutica de la presente invención es eficaz para una terapia génica del cáncer o la diabetes.

La locución "cáncer o diabetes", según se usa en la presente memoria, no está particularmente limitada con tal de que provoque el incremento en la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), e incluye cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, por ejemplo.

Esto es, una realización de la presente invención es un uso de un RNA de doble hebra que inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) en la fabricación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer o la diabetes. Mientras tanto, otra realización de la presente invención es un método para tratar el cáncer o la diabetes, que comprende administrar la composición farmacéutica de la presente invención a un ser humano.

En general, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse oralmente o parenteralmente a un ser humano en combinación con un portador farmacéutico farmacéuticamente aceptable. La forma de dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de los propósitos terapéuticos. Ejemplos específicos de la misma incluyen un comprimido, una píldora, un polvo, un líquido, una suspensión, una emulsión, un gránulo, una cápsula, un jarabe, un supositorio, una inyección, una pomada, un parche, una solución oftálmica y una gota nasal. Para preparar una formulación, puede usarse un aditivo tal como un vehículo, un aglutinante, un desintegrante, un lubricante, un estabilizante, un saborizante, un diluyente, un tensioactivo o un disolvente para inyección, que se usan ampliamente en un fármaco general como un portador farmacéutico.

La cantidad del RNA de doble hebra en la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada y puede seleccionarse apropiadamente. Por ejemplo, el siRNA está contenido en la composición preferiblemente dentro del intervalo de 50 $\mu\text{g/ml}$ a 300 $\mu\text{g/ml}$. La forma de administración de la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada y se determina apropiadamente dependiendo de la forma de dosificación, la zona de enfermedad de un paciente, el sexo y la edad de un paciente, otras condiciones y el grado del síntoma de la enfermedad, etc. La dosificación de un RNA de doble hebra en la composición farmacéutica de la presente invención se selecciona apropiadamente dependiendo de la utilización, la edad y el sexo del paciente, el grado de la enfermedad, otras condiciones, etc. Mientras tanto, el RNA de doble hebra en la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse una vez o varias veces al día.

Se considera que la composición farmacéutica de la presente invención es eficaz para el tratamiento del cáncer o la diabetes. La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse junto con un agente preventivo/terapéutico conocido para el cáncer o la diabetes o puede usarse separadamente antes o después del tratamiento con el agente preventivo/terapéutico. Si la composición se usa como anteriormente, puede potenciarse el efecto preventivo/terapéutico sobre el cáncer o la diabetes. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además el agente preventivo/terapéutico para el cáncer o la diabetes descrito anteriormente como un ingrediente activo, o alternativamente el agente preventivo/terapéutico para el cáncer o la diabetes descrito anteriormente y la composición farmacéutica de la presente invención pueden comercializarse separadamente y combinarse cuando se usan.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle por medio de ejemplos, pero la presente invención no está limitada a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Basándose en la secuencia de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (véase el N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185), cinco secuencias de 19 nucleótidos se seleccionaron como candidatos para un RNA de doble hebra que inhibe la expresión del gen. Estas secuencias tienen contenidos de GC de aproximadamente 50% y están menos afectadas por sus estructuras secundarias, y no corresponden a ninguna secuencia por encima de 17 nucleótidos de ningún gen distinto al gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática, según se clarifica mediante búsqueda por BLAST para todos los genes humanos.

Las secuencias de RNA (hebras antisentido) que tienen secuencias idénticas a las cinco secuencias descritas anteriormente están representadas por los N° ID SEC: 1 a 5 y 8, respectivamente.

El N° ID SEC: 1 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que comprende los nucleótidos 218-236 del N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185; el N° ID SEC: 2 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que comprende los nucleótidos 704-722 del N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185; el N° ID SEC: 3 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que comprende los nucleótidos 949-967 del N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185; el N° ID SEC: 4 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que comprende los nucleótidos 1009-1027 del N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185; el N° ID SEC: 5 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que comprende los nucleótidos 1321-1339 del N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185; y el N° ID SEC: 8 representa una secuencia de RNA idéntica a un DNA que comprende los nucleótidos 833-857 del N° de registro del GenBank/DDBJ AB008185.

Ejemplo 2

Se produjo un RNA de doble hebra que ha de estar contenido en la composición farmacéutica de la presente invención.

Esto es, RNA de doble hebra que tenían cada uno las cinco secuencias descritas anteriormente (siRNA) se prepararon usando el estuche Silencer siRNA Construction (fabricado por Ambion, Inc.). La preparación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas al estuche. Específicamente, la preparación se llevó a cabo como sigue.

En primer lugar, se sintetizaron dos tipos de oligonucleótidos que incluyen una secuencia de un siRNA de interés y una secuencia líder para una hebra sentido y una hebra antisentido, respectivamente. Se dejó que ambos oligonucleótidos se hibridaran con cebadores de promotor T7 (secuencias idénticas a una secuencia promotora de RNA T7 y una secuencia líder). Un DNA de plantilla para la transcripción de siRNA se sintetizó usando DNA polimerasa Exo-Klenow. La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo con RNA polimerasa T7 para sintetizar separadamente un RNA de la hebra sentido y un RNA de la hebra antisentido. Se dejó que ambas hebras se hibridaran para preparar un RNA de doble hebra. La secuencia líder no hibridada de ocho nucleótidos se descompuso mediante un tratamiento con RNasa específica para una sola hebra. Se llevó a cabo un tratamiento con DNasa para descomponer el DNA de la plantilla. Posteriormente, los siRNA se purificaron.

Los siRNA que tenían una secuencia representada por los N° ID SEC: 1 a 5 se producían separadamente mediante biosíntesis basada en tal reacción de transcripción *in vitro* y se usaron como muestras de prueba 1 a 5, respectivamente.

ES 2 343 193 T3

Las concentraciones de los siRNA en las muestras de prueba 1 a 5 eran 75 μ M, 63 μ M, 61 μ M, 65 μ M y 74 μ M, respectivamente. Mientras tanto, los mismos cinco siRNA se prepararon mediante síntesis química (encargado a Dharmacon Inc.). Por otra parte, como un control, una secuencia de control “revuelta”, modificada intercambiando nucleótidos en la secuencia de nucleótidos representada por el N° ID SEC: 1 aleatoriamente de modo que la secuencia no pueda reconocer un sitio diana, se produjo mediante síntesis química y se usó como una muestra de prueba 6. Mientras tanto, para las secuencias de nucleótidos representadas por los N° ID SEC: 2 a 5, se produjeron separadamente secuencias de control “revueltas” mediante síntesis química del mismo modo que anteriormente y se usaron como muestras de prueba 7 a 10, respectivamente.

10 Ejemplo 3

Para las muestras de prueba 1 a 10 respectivas, se prepararon muestras para la introducción en células. Específicamente, la preparación se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento.

15 Para las muestras 1 a 10 respectivas, se prepararon la solución A (una solución mixta de 10 μ l de Lipofectamine TM 2000 (fabricada por Invitrogen Corporation) y 250 μ l de Opti-MEM I (marca comercial registrada, fabricada por GIBCO)) y la solución B (una solución mixta de 4 μ g de una muestra de prueba y 250 μ l de Opti-MEM I (fabricado por GIBCO Inc.)). La solución A y la solución B se dejaron reposar separadamente a temperatura ambiente durante 5 minutos y a continuación se mezclaron entre sí, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, con lo que las muestras de prueba 1 a 10 para la introducción en células se prepararon para las muestras de prueba 1 a 6 respectivas.

Ejemplo 4

25 Las muestras de prueba 1 a 10 para la introducción en células se introdujeron transitoriamente en células HeLa de cáncer de cuello uterino humano y células DLD-1 de cáncer de colon, respectivamente. Específicamente, la introducción se llevó a cabo mediante el siguiente método.

30 Células HeLa de cáncer de cuello uterino humano y células DLD-1 de cáncer de colon se suspendieron en medio DMEM y se cultivaron en una placa hasta que la densidad celular llegaba a 70 a 80% de confluencia. Las muestras de prueba 1 a 10 para la introducción en células se añadieron separadamente a las soluciones de cultivo de las células descritas anteriormente, para transfectar las células de ese modo.

Ejemplo 5

35 Los efectos de los siRNA descritos anteriormente sobre la expresión de un gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática se examinaron cuantificando los niveles de mRNA del gen usando las células transfectadas que se preparaban en el Ejemplo 4.

40 Los RNA totales se extrajeron de las células HeLa de cáncer de cuello uterino (cultivadas durante 48 horas después de la transfección) transfectadas con las muestras de prueba 1 a 10 para la introducción en células, y sus cDNA se sintetizaron usando una transcriptasa inversa. Se llevó a cabo PCR en tiempo real usando los cDNA, y se cuantificó el nivel de mRNA del gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática. El mRNA de interés se detectó usando cebadores preparados basándose en la secuencia del gen de interés. Las secuencias de los cebadores se muestran en los N° ID SEC: 6 y 7.

Para corregir la diferencia en la preparación entre las muestras, el nivel de mRNA de un gen doméstico, porfobilinógeno desaminasa (PBGD), se cuantificó del mismo modo que anteriormente.

50 Los resultados de las pruebas revelaban que los siRNA procedentes de las muestras de prueba 1 a 5 inhibían la expresión del gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática, en comparación con las muestras de prueba 6 a 10 (controles “revueltos” para las muestras respectivas) según se describe posteriormente.

Muestra de prueba 4: la expresión se inhibía en 94%

55 Muestra de prueba 2: la expresión se inhibía en 45%

Muestras de prueba 1, 3 y 5: la expresión se inhibía en de 0 a 15%

60 Según se describió anteriormente, las muestras de prueba 2 y 4 inhibían la expresión, mientras que las muestras de prueba 1, 3 y 5 no inhibían significativamente la expresión.

Además, en el caso de usar el siRNA producido mediante síntesis química en lugar de los siRNA producidos mediante biosíntesis basada en reacciones de transcripción *in vitro*, se obtenían casi los mismos resultados. Además, en un experimento similar que usa las células DLD-1 de cáncer de colon en lugar de las células HeLa de cáncer de cuello uterino humano, se obtenían casi los mismos resultados.

Ejemplo 6

Los efectos de los siRNA sobre la expresión de un gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática se examinaron midiendo la actividad de sialidasa usando las células transfectadas que se prepararon en el Ejemplo 4. La actividad de sialidasa se midió como sigue. Las células HeLa de cáncer de cuello uterino humano transfectadas con las muestras de prueba 3 y 4 para la introducción en células se cultivaron en medio DMEM durante 48 horas. Las células se recogieron y se lavaron con solución salina fisiológica enfriada con hielo, seguido por sonicación durante 10 segundos, para preparar de ese modo soluciones de extracto celular en bruto.

Para las soluciones de extracto celular así obtenidas, la actividad de sialidasa se midió usando gangliósido como un sustrato. El sistema de reacción que contenía 10 μ l de acetato sódico 0,5 M (pH 4,6), 5 μ l de Triton X-100 al 1%, 10 nmol de gangliósido y 10 μ l de las soluciones de extracto celular en bruto se ajustó hasta un volumen total de 50 μ l con agua destilada. Las soluciones de 50 μ l se incubaron a 37°C durante de 30 a 60 minutos, y a continuación 10 μ l de las soluciones se usaron para marcar ácido siálico libre con fluorescencia usando DMB (1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno), seguido por análisis cuantitativo mediante cromatografía líquida de alta resolución. El ácido siálico se analizó de acuerdo con J. Chromatogr. 377, 111-119 (1986).

Mientras tanto, para una solución de extracto celular en bruto obtenida a partir de células no transfectadas, la actividad de sialidasa se midió como un control.

Los resultados revelaban que la actividad de sialidasa de las células transfectadas con la muestra de prueba 3 para la introducción en células, que se encontró que tenía poco efecto de inhibición de la expresión del mRNA del gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática en el Ejemplo 5, era una actividad específica aproximadamente igual a la del control (5,6 unidades/mg de proteína). Por otra parte, la actividad específica de sialidasa de las células transfectadas con la muestra de prueba 4 para la introducción en células, que se encontró que inhibía la expresión del mRNA de la sialidasa asociada con la membrana plasmática en 94% en el Ejemplo 5, se inhibía hasta 1,0 unidades/mg de proteína.

Esto mostraba que el siRNA que tenía la secuencia representada por el N° ID SEC: 4 tenía el efecto de inhibir la expresión del gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática a nivel proteínico así como a nivel del mRNA. A partir de este resultado, se predijo que el siRNA que tenía la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 tenía el efecto de inhibir la expresión del gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática a nivel proteínico así como a nivel del mRNA. En un experimento similar que usa las células DLD-1 de cáncer de colon en lugar de las células HeLa de cáncer de cuello uterino humano, se obtenían casi los mismos resultados.

Ejemplo 7

Para examinar el efecto de la inhibición de la expresión de un gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática por los siRNA que han de usarse en la presente invención sobre la proliferación celular de células cancerosas, se llevó a cabo el ensayo de MTT usando Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara Bio Inc.).

El ensayo de MTT se basa en el hecho de que el MTT (una de las sales de tetrazolio) se descompone en colorante de formazano mediante succinato-tetrazolio reductasa que está presente en la mitocondria de célula vivas. Los niveles de células vivas en las muestras pueden compararse al comparar las absorbancias de soluciones de muestra teñidas con colorante de formazano.

Células transfectadas con las muestras de prueba 2, 3, 4 y 9 para la introducción en células se cultivaron separadamente a de 1×10^4 a 7×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, y el muestreo se realizó 12, 24 y 48 horas después del inicio del cultivo. Se añadieron a las muestras respectivas 10 μ l de una solución que contenía una sal de tetrazolio y un reactivo de acoplamiento de electrones, y las muestras se incubaron durante 30 minutos, seguido por la medida de las absorbancias a 450 nm del producto de formazano usando un lector de microplacas.

Los resultados se muestran en la Fig. 1 posteriormente.

Según se muestra en la Fig. 1, se encontró que las células transfectadas con la muestra de prueba 2 para la introducción en células y las células transfectadas con la muestra de prueba 4 para la introducción en células tenían más efectos de inhibición de la proliferación celular, en comparación con las células transfectadas con la muestra de prueba 9 (control) para la introducción en células. En particular, se encontró que las células transfectadas con la muestra de prueba 4 para la introducción en células tenían el efecto más óptimo de inhibición de la proliferación celular. Mientras tanto, las células transfectadas con la muestra de prueba 3 para la introducción en células proliferaban en el mismo grado que el control y se encontró que tenían poco efecto de inhibición de la proliferación celular.

Estos resultados revelaban que el siRNA que tenía la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 ó 4 tenía más efectos de inhibición de la proliferación de las células HeLa de cáncer de cuello uterino humano en comparación con el control (la secuencia de control "revuelta" para el N° ID SEC: 4). En particular, se encontró que el siRNA que tiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 4 tenía un efecto excelente de inhibición de la proliferación celular. Mientras tanto, se encontró que el siRNA que tenía la secuencia representada por el N° ID SEC: 3, que no inhibía la

expresión del gen de sialidasa asociada con la membrana plasmática a niveles de mRNA y proteína, no tenía efecto de inhibición de la proliferación de células cancerosas.

En un experimento similar que usa las células DLD-1 de cáncer de colon en lugar de las células HeLa de cáncer de cuello uterino humano, se obtenían casi los mismos resultados.

Ejemplo 8

Para examinar el efecto de inhibición de la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática por los siRNA que han de usarse en la presente invención sobre la apoptosis de células cancerosas, el nivel de apoptosis se midió mediante el método de TUNEL usando *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (fabricado por Roche Corp.). Específicamente, la medida se llevó a cabo mediante el siguiente método de acuerdo con las instrucciones del estuche.

En primer lugar, células transfectadas con la muestra de prueba 4 para la introducción en células (1×10^6 células) se fijaron con paraformaldehído a temperatura ambiente durante 30 minutos. La muestra se lavó con agua destilada y se sometió a un tratamiento de permeación en membrana con una solución de penetración durante dos minutos con enfriamiento con hielo. Subsiguientemente, la muestra se lavó de nuevo, y se añadió a la misma la mezcla de reacción de TUNEL (que contenía TdT y dUTP) que contenía una enzima y un marcador, y la muestra se incubó a 37°C durante 60 minutos.

Mientras tanto, el mismo tratamiento que se describe anteriormente se llevó a cabo usando células transfectadas con la muestra de prueba 3 para la introducción en células en lugar de las células transfectadas con la muestra de prueba 4 para la introducción en células.

Posteriormente, el número de colorante fluorescente dUTP (FITC) conectado a fragmentos de DNA mediante TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) en ambas muestras se detectó usando un citómetro de flujo (fabricado por Becton Dickinson). En este procedimiento, fluorescencia que tenía una longitud de onda de FL1 (530 nm $\pm$ 15 nm) se detectó usando una luz de excitación que tenía una longitud de onda de 488 nm.

Los resultados se muestran en la Fig. 2.

Los resultados de la Fig. 2 revelaban que, en el caso se las células transfectadas con la muestra de prueba 4 para la introducción en células, se inducía apoptosis en 91,3% de las células. Esto es, se encontró que el RNA de doble hebra de la presente invención (el siRNA que tiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 4) inducía la apoptosis de células cancerosas.

En un experimento similar que usa las células DLD-1 de cáncer de colon en lugar de las células HeLa de cáncer de cuello uterino humano, se obtenían casi los mismos resultados.

Ejemplo 9

Se sintetizó el siRNA que tiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 8 (encargado a iGENE Therapeutics, Inc.).

Del mismo modo que en los Ejemplos 3 y 4, el siRNA descrito anteriormente se introdujo transitoriamente en las células HeLa. A continuación, del mismo modo que el Ejemplo 5, se cuantificó el nivel de mRNA de NEU3. Además, del mismo modo que en el Ejemplo 8, se midió el grado de apoptosis mediante el método de TUNEL. Un RNA de doble hebra que tenía la secuencia de nucleótidos representada por el N° ID SEC: 9 se usó como un control "revuelto". Los resultados revelaban que la expresión del mRNA de NEU3 estaba inhibida en 94%. Mientras tanto, se inducía apoptosis en 85% de las células.

Aplicabilidad industrial

El RNA de doble hebra en la composición farmacéutica de la presente invención inhibe eficazmente la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3), que se sugiere intensivamente que está implicado en el cáncer o la diabetes. Mientras tanto, el RNA de doble hebra en la composición farmacéutica de la presente invención inhibe la expresión del gen, dando como resultado la inhibición de la proliferación de células cancerosas y la inducción de la apoptosis. Los resultados revelaban que la composición farmacéutica de la presente invención es eficaz para una terapia génica del cáncer o la diabetes.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica que muestra los efectos de la inhibición de la proliferación de células cancerosas mediante la introducción de los siRNA.

La Fig. 2 es una gráfica que muestra los efectos de los siRNA sobre la muerte celular.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento del cáncer o la diabetes, que comprende un RNA de doble hebra mostrado en (A) o (B):

(A) un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia representada por el N° ID SEC: 2, el N° ID SEC: 4 o el N° ID SEC: 8;

(B) un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 19 a 23 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 2 o el N° ID SEC: 4, o

un RNA de doble hebra que consiste en una secuencia de 25 a 30 nucleótidos que es idéntica a una secuencia parcial de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3) y contiene la secuencia representada por el N° ID SEC: 8, y

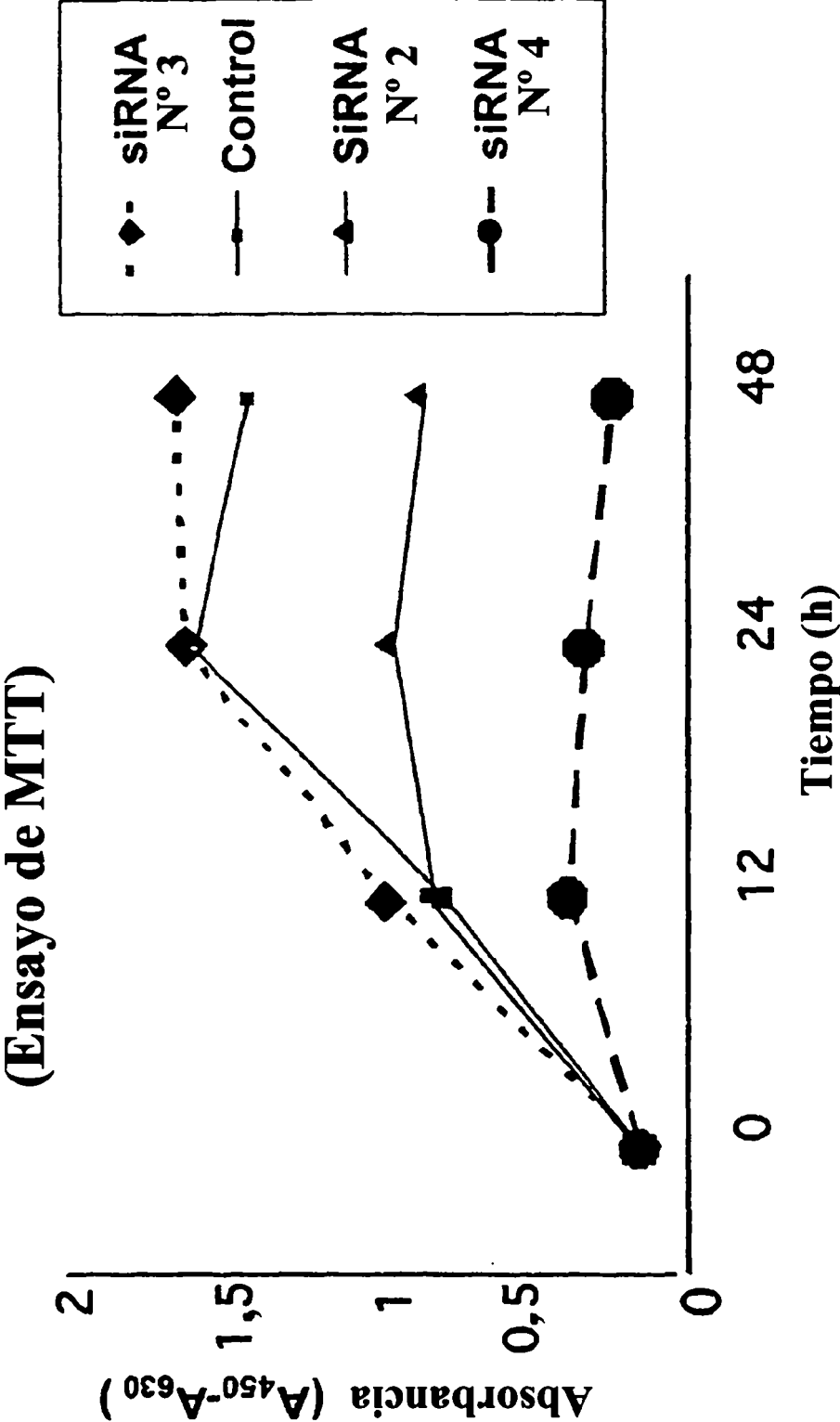
el RNA de doble hebra inhibe la expresión de un gen que codifica sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3).

2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el RNA de doble hebra comprende además un extremo saliente 3' de 1 a 4 nucleótidos.

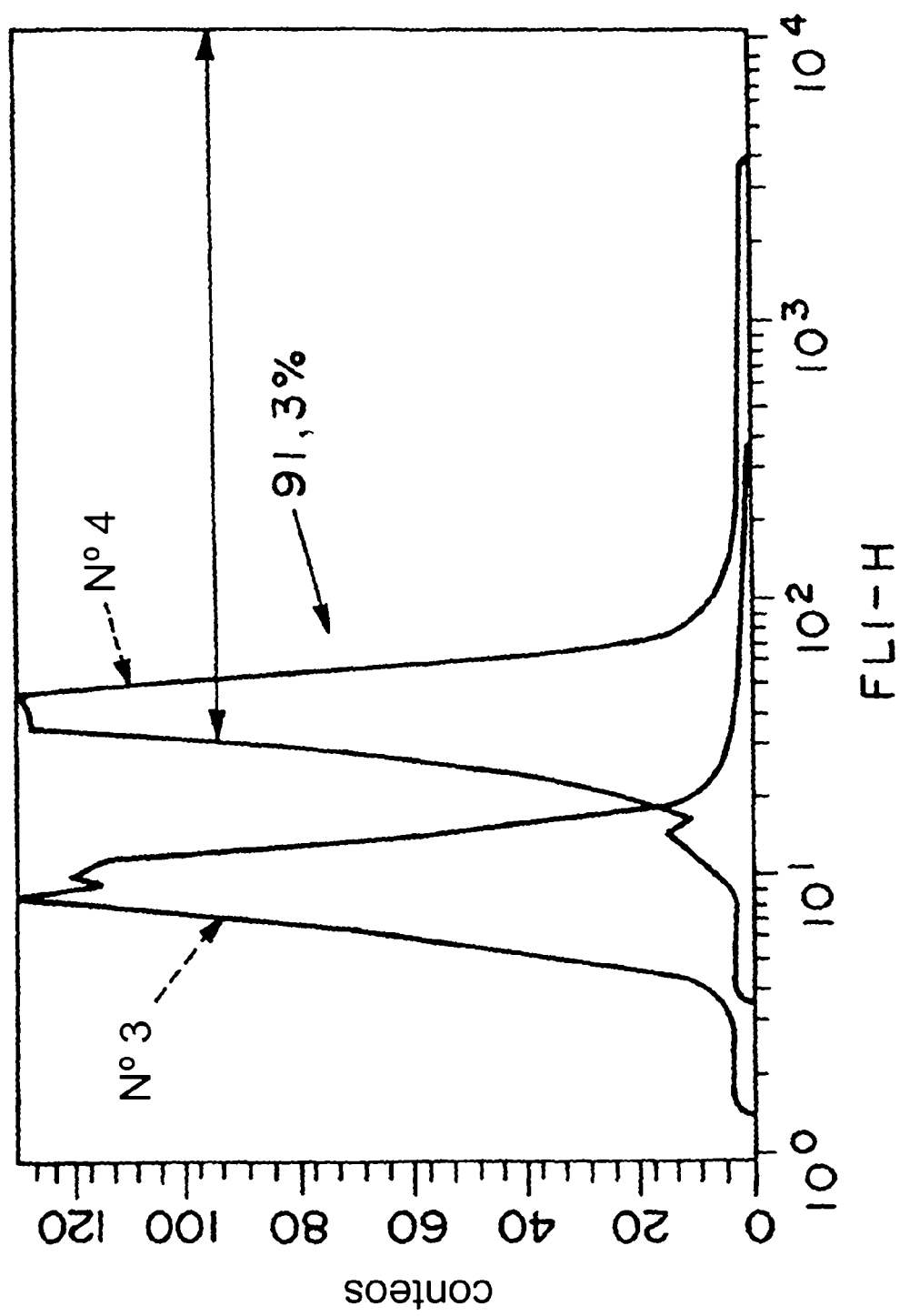
3. La composición farmacéutica para el uso en el tratamiento del cáncer o la diabetes, que comprende un vector que tiene una secuencia de nucleótidos capaz de expresar el RNA de doble hebra de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en células humanas.

4. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer o la diabetes provoca un incremento en la expresión de un gen de sialidasa humana asociada con la membrana plasmática (NEU3).

[Fig. 1]



[Fig. 2]



ES 2 343 193 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Miyagi ken	
5	<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA TRATAR EL CÁNCER O LA DIABETES	
	<130> 0P-C5224-PCT	
10	<150> JP2004-335774	
	<151> 2004-11-19	
	<160> 9	
15	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> RNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> RNA sintético	
25	<400> 1	
	ggaagaugac agagggauu	19
30	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> RNA	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> RNA sintético	
40	<400> 2	
	guauaccuac uacaucucu	19
45	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> RNA	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> RNA sintético	
55	<400> 3	
	gugaaggcuu ucagagacu	19
60	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> RNA	
65	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

ES 2 343 193 T3

	<223> RNA sintético	
	<400> 4	
5	aaggagugu gguaaguuu	19
	<210> 5	
10	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> RNA sintético	
	<400> 5	
20	guuuguuuga augugggac	19
	<210> 6	
25	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 6	
35	gactggtcat ccctgcgtat	20
	<210> 7	
40	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 7	
50	gagccatgat tctgacgtgt t	22
	<210> 8	
55	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> RNA sintético	
	<400> 8	
65	gguuacagua gaaugugaag uggca	25

ES 2 343 193 T3

	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> RNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> RNA sintético	
10		
	<400> 9	
	gcgauuaaug uagguucga	19
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		