

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 446**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07872618 .9**
- 96 Fecha de presentación: **17.09.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2061907**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

54 Título: **EXPRESIÓN DE TCL1 EN LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC) REGULADA POR MIR-29 Y MIR-181.**

30 Prioridad:  
**19.09.2006 US 845657 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2012**

73 Titular/es:  
**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION  
1960 KENNY ROAD  
COLUMBUS, OH 43210-1063, US**

72 Inventor/es:  
**CROCE, Carlo, M.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 374 446 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**

Expresión de *TCL1* en la leucemia linfocítica crónica (LLC) regulada por MIR-29 y MIR-181

- 5 La presente invención se financió, total o parcialmente, con subvenciones del NIH, número de subvención/contrato PO1 CA81534. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

**Antecedentes de la invención**

- 10 La leucemia linfocítica crónica (LLC-B) es la leucemia humana más frecuente en todo el mundo, constituyendo aproximadamente 10.000 casos nuevos todos los años en EE.UU.<sup>1</sup> El oncogen *TCL1* (leucemia de células T/linfoma 1) se descubrió como diana de frecuentes reorganizaciones cromosómicas en 14q31.2 en las leucemias de células T maduras.<sup>2</sup> Anteriormente se ha dado a conocer que los ratones transgénicos que expresan *TCL1* en las células B desarrollan LLC-B.<sup>3</sup> En el presente documento, el inventor cree ahora que la alteración de la regulación de *TCL1* puede ser un acontecimiento causal en la patogenia de la LLC-B, ya que el inventor ha demostrado también que el *TCL1* es un co-activador de la oncoproteína Akt, una molécula crucial en la transducción de las señales anti-apoptosis en las células B y T.<sup>4</sup>

- 20 En un informe reciente se ha sugerido que una expresión elevada de *TCL1* en la LLC humana se correlaciona con un estado de  $V_H$  sin mutar y positividad para ZAP70, lo que sugiere que la LLC dirigida por *TCL1* es una forma agresiva de LLC-B.<sup>5</sup> Uno de los factores genéticos más significativos asociados con un mal pronóstico de la LLC-B es la delección en el cromosoma 11q.<sup>6</sup>

- 25 Los microARN son una familia grande de genes no codificadores altamente conservados que se piensa que están implicados en la regulación génica temporal y específica de tejido.<sup>7</sup> Recientemente, los inventores han demostrado que los perfiles de expresión de los microARN se pueden usar para distinguir las células B normales de las células de LLC-B malignas y que las firmas de microARN están asociadas con el pronóstico y la progresión de la leucemia linfocítica crónica.<sup>8,9</sup>

- 30 El documento WO 2005/118806 divulga que miR-181b se expresa a niveles elevados en muestras de leucemia linfocítica crónica (LCC) en comparación con los controles sanos y divulga además que los miARN que constantemente se ha observado que están regulados por disminución o por aumento en pacientes con LLC se podrían usar para diagnosticar pacientes y que estos miARN representan posibles dianas para desarrollo terapéutico.

- 35 Actualmente no se dispone de ningún procedimiento de éxito universal para el tratamiento o la prevención de la LLC-B. El curso del tratamiento a menudo se selecciona en base a varios parámetros pronósticos, incluido un análisis de marcadores tumorales específicos.

- 40 A pesar de la considerable investigación sobre terapias para la LLC-B, la LLC sigue siendo difícil de diagnosticar y tratar con eficacia y la mortalidad observada en los pacientes indica que se necesitan mejoras en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad.

**Sumario de la invención**

- 45 La presente invención se basa, en parte, en la identificación de una firma específica de cáncer de leucemia linfocítica crónica de miARN que se expresan de forma diferencial en las células del cáncer de mama, con respecto a las células normales control.

- 50 De acuerdo con esto, la invención abarca procedimientos de diagnóstico, tenga un sujeto, o esté en riesgo de desarrollar, leucemia linfocítica crónica (LLC-B), que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en el que una alteración en el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo, respecto al nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra control, es indicativo del sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, LLC-B.

- 55 En ciertas realizaciones, al menos un producto génico de miR es miR-29 o miR-181. En ciertas realizaciones, el al menos un producto génico de miR es miR-29b y/o miR-181b.

- 60 El nivel del al menos un producto génico de miR se puede medir usando diversas técnicas que son bien conocidas para los expertos en la técnica. En una realización, el nivel del al menos un producto génico de miR se mide usando análisis de transferencia Northern. En otra realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del correspondiente producto génico de miR en la muestra control. Asimismo, en otra realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo puede ser mayor que el nivel del correspondiente producto génico de miR en la muestra control.

- 65 La invención también proporciona procedimientos de diagnóstico de una LLC-B asociada con uno o más marcadores

pronósticos en un sujeto, que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de LLC-B de dicho sujeto, en el que una alteración en el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo, respecto al nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra control, es indicativo del sujeto que tiene LLC-B asociada con el uno o más marcadores pronósticos. En una realización, el nivel del al menos un producto génico de miR se mide mediante transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicas del miARN, para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y, comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control. Una alteración en la señal del al menos un miARN es indicativa del sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, LLC-B.

La invención también abarca procedimientos de tratar la LLC en un sujeto, en los que la regulación de la señal del al menos un miARN, respecto a la señal generada a partir de la muestra control, está alterada (p. ej., regulada por disminución, regulada por aumento).

En ciertas realizaciones, una micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR29 o miR-181 y combinaciones de los mismos.

La invención también abarca procedimientos de diagnóstico, tenga un sujeto, o estén en riesgo de desarrollar, una LLC-B asociada con uno o más marcadores pronósticos adversos en un sujeto mediante transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicas del miARN, para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y, comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control. Una alteración en la señal es indicativa del sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, el cáncer.

La invención también abarca procedimientos de tratar la LLC-B en un sujeto que tiene una LLC-B en la que al menos un producto génico de miR está regulado por disminución o regulado por aumento en las células cancerosas del sujeto con respecto a las células control. Cuando el al menos un producto génico de miR está regulado por disminución en las células cancerosas, el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR aislado, de modo que la proliferación de las células cancerosas en el sujeto está inhibida. Cuando el al menos un producto génico de miR está regulado por aumento en las células cancerosas, el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR aislado, de modo que la proliferación de las células cancerosas en el sujeto está inhibida. En ciertas realizaciones, el al menos un producto génico de miR aislado se selecciona de miR-29, miR-181 y combinaciones de los mismos.

En realizaciones relacionadas, la invención proporciona procedimientos de tratar la LLC-B en un sujeto, que comprende: determinar la cantidad del al menos un producto génico de miR en células de LLC-B, respecto a las células control; y alterar la cantidad del producto génico de miR expresado en las células de LLC-B mediante: Administración al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR aislado, si la cantidad del producto génico de miR expresado en las células cancerosas es inferior a la cantidad de producto génico de miR expresado en las células control; o administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR, si la cantidad del producto génico de miR expresado en las células cancerosas es superior a la cantidad del producto génico de miR expresado en las células control, de modo que se inhibe la proliferación de las células cancerosas en el sujeto. En ciertas realizaciones, el al menos un producto génico de miR aislado se selecciona del grupo constituido por miR-29, miR-181 y combinaciones de los mismos.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas para tratar la LLC-B, que comprende al menos un producto génico de miR aislado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización concreta, las composiciones farmacéuticas con el al menos un producto génico de miR aislado corresponde a un producto génico de miR que está regulado por disminución en las células de LLC-B respecto a las células control adecuadas. En realizaciones concretas, la composición farmacéutica se selecciona del grupo constituido por miR-29, miR-181 y combinaciones de los mismos. En otra realización concreta, la composición farmacéutica comprende al menos un compuesto inhibidor de la expresión de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Asimismo, en una realización concreta, la composición farmacéutica comprende al menos un compuesto inhibidor de la expresión de miR que es específico del producto génico de miR que está regulado por aumento en las células de LLC-B respecto a las células control adecuadas.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de identificación de un agente anti-LLC-B, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con menores niveles de expresión en células de LLC-B, en los que un incremento del nivel del producto génico de miR en la célula, respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-LLC-B. En ciertas realizaciones, producto génico de miR se selecciona del grupo constituido por miR-29, miR-181 y combinaciones de los mismos.

La presente invención también proporciona procedimientos de identificación de un agente anti-LLC-B, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con mayores niveles de expresión en células de LLC-B, en los que una disminución del nivel del producto génico de miR en la célula, respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-LLC-B. En una realización concreta, el producto génico de miR se selecciona del grupo constituido por miR-29, miR-181 y combinaciones de los mismos.

Varios objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferida, cuando se lea a la luz de las figuras adjuntas.

### Descripción breve de las figuras

Figuras 1a-1f – Expresión de *TCL-1* está regulada por miR29 y miR181.

Fig. 1a – Expresión de *TCL-1* en la LLC. Calles 1-8, muestras de LLC. Calles 2 y 6: La expresión de *TCL-1* se clasificó como baja. En todas las demás calles, la expresión de *TCL-1* se clasificó como de alta a muy alta.

Fig. 1b - Expresión de *TCL-1* en tres grupos de LLC-B. Las barras representan el número relativo de muestras de LLC-B indicadas.

Fig. 1c – Alineación de la secuencia de *miR-29b* y *miR-181b* y la 3' UTR de *TCL1*.

Fig. 1d – Expresión de *TCL1* diana con *miR-29* y *miR-181* en ensayos de luciferasa. Para los ensayos de luciferasa con *miR-29*, un fragmento del ADNc de *TCL1* que incluía una región complementaria a *miR-29* (Tcl1) se insertó usando el sitio XbaI inmediatamente después del codón de terminación de la luciferasa en el vector pGL3 (Promega, Madison, WI) que contiene la construcción o el vector pGL3 solo, tal como se ha indicado. Para los ensayos de *miR-181*, el ADNc de *TCL1* de longitud completa se insertó en el vector pGL3 en orientación sentido (Tcl1FL) o antisentido (Tcl1FLAS). 293 células se co-transfeccionaron con *miR-29b* o control negativo *scramble*, como se ha indicado, y la construcción de pGL3 que contiene una parte del ADNc de *TCL1* que incluye una región homóloga a *miR-29* (Tcl1) o el vector pGL3 solo, tal como se ha indicado. Para los ensayos con *miR-181*, *TCL1FL* o *TCL1FLAS* se co-transfeccionaron con *miR-181*. Las actividades de luciérnaga y de renilla luciferasa se analizaron con el sistema de ensayo doble de la luciferasa (Promega) y la actividad luciferasa de luciérnaga se normalizó con la actividad de luciferasa de renilla, como sugirió el fabricante. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La Fig. 1 (d) muestra una micrografía electrónica de barrido con un aumento medio (aproximadamente x400) de la estructura multilocular de película fina hecha de colágeno de acuerdo con la presente invención. Efecto de *miR-29b* y *miR-181b* sobre la expresión proteica de *TCL1*. 293 células se transfeccionaron con *pcDNA3TCL1fl* (un vector de expresión en mamíferos que contiene el ADNc de longitud completa de *TCL1*) solo (calle 1) o se co-transfeccionaron con *pcDNA3TCL1fl* y miR-29b (calle 2) control negativo pre-miR (calle 3) o *miR-181b* (calle 4). La expresión de *TCL1* se detectó mediante transferencia Western usando anticuerpos anti-*TCL1*.

Fig. 1f – Correlación de la expresión proteica de *TCL1* con *miR-181b* y *miR-296* mediante micromatriz. Los valores representan la señal de hibridación en micromatriz de microARN.

Las figuras 2a y 2b – Análisis de RT-PCR en tiempo real de muestras de LLC representativas. Se escogieron tres muestras con expresión alta (25, 37 y 41) y cuatro muestras con expresión baja (55, 56, 72 y 81) de *miR-181* y *miR-29*. El análisis RT-PCR en tiempo real (ABI) se llevó a cabo para *miR-181a*, *miR-181b*, *miR-181c*, *miR-181d*, *miR-29a*, *miR-29b* y *miR-29c* de acuerdo con el protocolo del fabricante. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La Fig. 3 contiene la Tabla 1, que muestra los microARN estadísticamente significativos que diferencian subtipos de LLC.

Las figuras 4a -4d contienen información de la muestra de LLC: La Fig. 4a contiene información de la muestra de LLC; la Fig. 4b contiene información de LLC agresiva; la Fig. 4c contiene LLC agresiva con delección de 11q. La medición del estado mutacional de los genes de  $V_H$  de los expresados y el inmunofenotipado para ZAP-70 se realizaron como se ha descrito anteriormente (Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, y col. N Engl. J. Med. 2004; 351 :893-901). Se realizó la técnica FISH usando las sondas Vysis convencionales para el panel de LLC. Estos ensayos FISH pueden detectar las siguientes anomalías cromosómicas (conjuntos de sondas): 11 q- y 17p- (ATM en 11 q23 y P53 en 17p13.1), 13q- y trisomía 12 (D13S319 en 13q14, LAMP1 en 13q34 y D12Z3 en el centrómero 12).

La Fig. 5 contiene la Tabla 2, que muestra la comparación pareada de la expresión de microARN en tres tipos de LLC-B.

### Descripción detallada de la realización preferida

La presente invención demuestra que la alteración de la regulación del encogen *TCL1* es un acontecimiento causal en la patogenia de la forma agresiva de esta enfermedad, como se comprobó usando modelos de animales. Para estudiar el mecanismo de la regulación de *TCL1* en la LLC, se llevó a cabo un perfil de la expresión de microARN de los tres tipos de LLC: LLC indolente, LLC agresiva y LLC agresiva que muestra una delección de 11q. Se identificaron las distintas firmas de microARN correspondientes a cada grupo de LLC. Además, se identificó que la expresión de *TCL1* estaba regulada por *miR-29* y *miR-181*, dos microARN expresados de forma diferencial en la LLC. Los niveles de expresión de *miR-29* y *miR-181*, en general, se correlacionaron de forma inversa con la expresión de *TCL1* en las muestras de LLC que se analizaron. En el presente documento se muestra que la expresión de *TCL1* en la LLC está, al menos en parte, regulada por *miR-29* y *miR-181* y que estos miARN pueden ser candidatos a agentes terapéuticos en las LLC que sobreexpresan *TCL1*.

Como se usa en el presente documento de forma intercambiable, un “producto génico de miR”, “microARN” o “miR” o “miARN” se refiere al transcrito de ARN procesado o sin procesar de un gen *miR*. Dado que los productos del gen miR no se traducen en proteína, el término “producto génico de miR” no incluye proteínas. El transcrito del gen miR sin procesar también se denomina “precursor de miR”, y normalmente comprende un transcrito de ARN de aproximadamente 70-100 nucleótidos de longitud. El precursor de miR se puede procesar mediante digestión con una ARNasa (por ejemplo, Dicer, Argonaut, o ARNasa III, p. ej., ARNasa III de *E. coli*) en una molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos. Esta molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos también se denomina transcrito del gen miR “procesado” o miARN “maduro”.

La molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos se puede obtener del precursor de miR a través de rutas de procesamiento naturales (p. ej., usando células intactas o lisados celulares) o mediante rutas de procesamiento sintética (p. ej., usando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonaut o ARNasa III aisladas). Se entiende que la molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos también se puede producir directamente mediante síntesis biológica o química sin tener que haberla procesado desde el precursor de miR.

La presente invención abarca procedimientos de diagnóstico, tenga un sujeto, o esté en riesgo de desarrollar LLC, que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo de dicho sujeto y comparar el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo con el nivel de un correspondiente producto génico de miR de una muestra control. Como se usa en el presente documento, un “sujeto” puede ser cualquier mamífero que tiene, o se sospecha que tiene, cáncer de mama. En una realización concreta, el sujeto es un ser humano que tiene, o se sospecha que tiene, LLC.

El nivel de al menos un producto génico de miR se puede medir en células de una muestra biológica obtenido del sujeto. Por ejemplo, se puede extraer una muestra de tejido de un sujeto que se sospecha que tiene LLC, asociada con técnicas de biopsia convencionales. En otro ejemplo, se puede extraer una muestra de sangre del sujeto y los glóbulos blancos se pueden aislar para extracción del ADN mediante técnicas estándar. La muestra de sangre o de tejido se obtiene, preferentemente, del sujeto antes del inicio de la radioterapia, la quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Se puede obtener un correspondiente muestra control de tejido o de sangre de tejidos no afectados del sujeto, de un ser humano normal individual o de una población de individuos normales, o de células cultivadas correspondientes a la mayoría de las células en la muestra del sujeto. Después, la muestra control de tejido o de sangre se procesa junto con la muestra del sujeto, de modo que los niveles de producto génico de miR producido a partir de un gen miR dado en células de la muestra del sujeto se puede comparar con los niveles del correspondiente producto génico de miR de las células de la muestra control.

Una alteración (es decir, un incremento o disminución) en el nivel de un producto génico de miR en la muestra obtenida del sujeto, con respecto al nivel de un correspondiente producto génico de miR en una muestra control, es indicativa de la presencia de LCC en el sujeto. En una realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es superior al nivel del correspondiente producto génico de miR en la muestra control (es decir, la expresión del producto génico de miR está “regulada por aumento”). Como se usa en el presente documento, la expresión de un producto génico de miR está “regulada por aumento” cuando la cantidad de producto génico de miR en una muestra de célula o tejido de un sujeto es superior a la cantidad del mismo producto génico en una muestra control de célula o tejido. En otra realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es inferior al nivel del correspondiente producto génico de miR en la muestra control (es decir, la expresión del producto génico de miR está “regulada por disminución”). Como se usa en el presente documento, la expresión de un gen miR está “regulada por disminución” cuando la cantidad de producto génico de miR producido a partir de dicho gen en una muestra de célula o tejido de un sujeto es inferior a la cantidad producida a partir del mismo gen en una muestra control de célula o tejido. La expresión relativa del gen miR en las muestras control y normal se puede determinar con respecto a uno o más patrones de expresión de ARN. Los patrones pueden comprender, por ejemplo, un nivel de expresión del gen miR de cero, el nivel de expresión del gen miR en una línea celular estándar o el nivel medio de expresión del gen miR obtenido previamente para una población de controles humanos normales.

El nivel de un producto génico de miR en una muestra se puede medir usando cualquier técnica que sea adecuada

para detectar niveles de expresión de ARN en una muestra biológica. Técnicas adecuadas para determinar el nivel de expresión de ARN en células de una muestra biológica (p. ej., análisis de transferencia Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*) son bien conocidas para los expertos en la técnica. En una realización concreta, el nivel de al menos un producto génico de miR se detecta usando análisis de transferencia Northern. Por ejemplo, el ARN celular total se puede purificar a partir de las células mediante homogeneización en presencia de tampón de extracción de ácido nucleico, seguido de centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan y el ADN se elimina mediante tratamiento con ADNasa y precipitación. Después, las moléculas de ARN se separan mediante electroforesis en gel sobre geles de agarosa de acuerdo con técnicas estándar y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. El ARN se inmoviliza después sobre los filtros mediante calentamiento. La detección y cuantificación del ARN específico se consigue usando sondas de ADN o de ARN adecuadamente marcadas complementarias al ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7. Las sondas adecuadas para hibridación de transferencia Northern de un producto génico de miR dado se pueden producir a partir de las secuencias de ácido nucleico del miR dado. Los procedimientos para la preparación de sondas de ADN y de ARN marcadas y las condiciones de hibridación de las mismas a secuencias nucleotídicas diana se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11.

Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico se puede marcar con, por ejemplo, un radionúclido, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^{35}\text{S}$ , un metal pesado o un ligando capaz de funcionar como un miembro del par de unión específica para un ligando marcado (p. ej., biotina, avidina o un anticuerpo), una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una enzima o similar.

Las sondas se pueden marcar una actividad específica elevada mediante el procedimiento de desplazamiento de mella de Rugby y col. (1977), *J. Mol. Biol.* 113:237-251 o mediante el procedimiento de cebado aleatorio de Fienberg y col. (1983), *Anal. Biochem.* 132:20 6-13. Este último es el procedimiento de elección para sintetizar sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  de actividad específica alta a partir de moldes de ADN monocatenario o de ARN. Por ejemplo, sustituyendo los nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radioactivos de acuerdo con el procedimiento de desplazamiento de mella, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas con  $^{32}\text{P}$  con una actividad específica muy superior a  $10^8$  cpm/microgramo. La detección autoradiográfica de la hibridación se puede realizar después exponiendo los filtros hibridados a una película fotográfica. La densitometría de las películas fotográficas expuestas mediante los filtros hibridados proporciona una medición precisa de los niveles del transcrito del gen miR. Usando otro enfoque, los niveles del transcrito del gen miR se pueden cuantificar mediante sistemas de imagen computerizada, tal como *Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager* disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Cuando el marcaje con radionúclidos de las sondas de ADN o de ARN no es práctico, se puede usar el procedimiento de cebado aleatorio para incorporar un análogo, por ejemplo el análogo de TTP 5-(N-(N-biotinil-epsilon-aminocaproil)-3-aminoalil)desoxiuridina trifosfato, en la molécula de sonda. El oligonucleótido de sonda biotinilado se puede detectar mediante reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina y anticuerpos (p. ej., anticuerpos anti-biotina) acopladas a pigmentos fluorescentes o enzimas que producen reacciones de color.

Además de las técnicas Northern y otras de hibridación de ARN, determinar los niveles de los transcritos de ARN se puede conseguir usando la técnica de la hibridación *in situ*. Esta técnica requiere menos células que la técnica de transferencia Northern e implica depositar células enteras sobre un cubre de microscopio y sondear el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contiene sondas de ácido nucleico radioactivo o marcado de otro modo (p. e., ADNc o ARN). Esta técnica es particularmente adecuada para analizar muestras de biopsia de tejidos procedentes de sujetos. La práctica de la técnica de hibridación *in situ* se describe con mayor detalle en la patente de EE.UU. 5.427.916. Las sondas adecuadas para la hibridación *in situ* de un producto génico de miR dado se pueden producir a partir de las secuencias de ácido nucleico.

El número relativo de transcritos del gen miR en las células también se puede determinar mediante transcripción inversa de los transcritos del gen miR, seguido de amplificación de los transcritos sometidos a transcripción inversa mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de los transcritos del gen miR se pueden cuantificar en comparación con un patrón interno, por ejemplo el nivel de ARNm de un gen "doméstico" presente en la misma muestra. Un gen "doméstico" adecuado para usar como patrón interno incluye, por ejemplo, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los procedimientos para la RT-PCR cuantitativa y variaciones de los mismos entran dentro de la experiencia en la técnica.

En algunos casos, puede ser deseable determinar de forma simultánea el nivel de expresión de una pluralidad de diferentes productos génicos de miR en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes miR conocidos con un cáncer. Evaluar los niveles de expresión específicos de cáncer para cientos de genes miR consume tiempo y requiere una gran cantidad de ARN total (al menos 20  $\mu\text{g}$  para cada transferencia Northern) y técnicas autoradiográficas que requieren isótopos radioactivos.

Para superar estas limitaciones se puede construir una oligobiblioteca en formato de microchip (es decir, una micromatriz) que contenga sondas oligodesoxinucleotídicas que son específicas de un grupo de genes miR. Usando dicha micromatriz, el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica se puede determinar mediante transcripción inversa de los ARN para generar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana e hibridarlos con sondas oligodesoxinucleotídicas sobre la micromatriz para generar un perfil de hibridación, o de expresión. Después, el perfil de hibridación de la muestra de ensayo se puede comparar con el de una muestra control, para determinar qué microARN tienen un nivel de expresión alterado en la LLC. Como se usa en el presente documento, "sonda oligonucleotídica" o "sonda oligodesoxinucleotídica" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridar con un oligonucleótido diana. "Oligonucleótido diana" u "Oligodesoxinucleótido diana" se refiere a una molécula que se va a detectar (p. ej., mediante hibridación). Con "sonda oligonucleotídica específica de miR" o "sonda oligonucleotídica específica de un miR" se quiere decir una sonda oligonucleotídica que tiene una secuencia seleccionada para hibridar con un producto génico de miR específico o a un transcrito inverso del producto génico de miR específico.

Un "perfil de expresión" o "perfil de hibridación" de una muestra concreta es, esencialmente, una huella del estado de la muestra; mientras que dos estados pueden tener un gen concreto expresado de forma similar, la evaluación de una serie de genes de forma simultánea permite la generación de un perfil de expresión génica único para el estado de la célula. Es decir, las células normales se pueden distinguir de las células de LLC y entre células de LLC, se pueden determinar diferentes estados pronósticos (por ejemplo, perspectivas de supervivencia buena o mala a largo plazo). Comparando los perfiles de expresión de las células de LLC en diferentes estados se obtiene la información sobre los genes son importantes (incluida la regulación por aumento o por disminución de los genes) en cada uno de estos estados. La identificación de las secuencias expresadas de forma diferente en células de LLC o en células normales, así como la expresión diferencial resultante en diferentes resultados pronósticos, permite el uso de esta información de numerosas formas. Por ejemplo, se puede evaluar un régimen de tratamiento concreto (p. ej., para determinar su un fármaco quimioterapéutico actúa mejorando el pronóstico a largo plazo en un paciente concreto. De un modo similar, el diagnóstico se puede establecer o confirmar comparando muestras de pacientes con los perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión (o genes individuales) permiten la detección selectiva de fármacos candidato que suprimen el perfil de expresión de LLC o convierten un perfil de mal pronóstico en un perfil de pronóstico mejor.

De acuerdo con esto, la invención proporciona procedimientos de diagnóstico, tenga un sujeto, o esté en riesgo de desarrollar, LLC, que comprende la transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende sondas oligonucleotídicas específicas del miARN, para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo y comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control, en los que una alteración de la señal del al menos un miARN es indicativa del sujeto que tiene, o están en riesgo de desarrollar, LLC.

En una realización, la micromatriz comprende sondas oligonucleotídicas específicas de miARN para una porción considerable del miRNoma humano. En una realización concreta, la micromatriz comprende sondas oligonucleotídicas específicas de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR29 o miR-181 y combinaciones de los mismos.

La micromatriz se puede preparar a partir de sondas oligonucleotídicas específicas generadas a partir de secuencias de miARN conocidas. La matriz puede contener dos sondas oligonucleotídicas diferentes para cada miARN, conteniendo una la secuencia activa madura y siendo la otra específica del precursor del miARN. Asimismo, la matriz puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que difieren de ortólogos humanos en sólo unas pocas bases, que puede servir como controles para hibridación en condiciones rigurosas. Los ARNt de ambas especies también se pueden imprimir sobre el microchip, lo que proporciona un control positivo interno relativamente estable para hibridación específica. En el microchip también se pueden incluir uno o más controles adecuados para hibridación inespecífica. Para este fin, las secuencias se seleccionan en base a la ausencia de cualquier homología con cualquier miARN conocido.

La micromatriz se puede fabricar usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, sondas oligonucleotídicas de una longitud adecuada, por ejemplo 40 nucleótidos, son las modificadas con 5'-amina en la posición C6 y se imprimen usando sistemas de micromatriz disponibles comercialmente, por ejemplo los portas activados de GenMachine OmniGrid™ 100 Microarrayer y Amersham CodeLink™. El oligómero de ADNc marcado correspondiente a los ARN dianas se prepara mediante transcripción inversa del ARN diana con un cebador marcado. Tras la síntesis de la primera hebra, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de este modo hibridan después con el chip de la micromatriz en condiciones de hibridación, por ejemplo 6X SSPE/30 % de formamida a 25 °C durante 18 horas, seguido de lavado en 0,75C de TNT a 37 °C durante 40 minutos. En las posiciones de la matriz en las que la sonda de ADN inmovilizada reconoce un ADNc diana complementario en la muestra se produce hibridación. El ADNc diana marcado marca la posición exacta sobre la matriz en la que se produce la unión, lo que permite la detección y cuantificación automáticas. El resultado consiste en una lista de acontecimientos de hibridación que indican la abundancia relativa de secuencias de ADNc específico y, por tanto, la abundancia relativa de los miR complementarios correspondientes, en la muestra del paciente. De acuerdo con una realización, el oligómero de

ADNc marcado es un ACNc marcado con biotina preparado a partir de un cebador marcado con biotina. Después, la micromatriz se procesa mediante detección directa de los transcritos que contienen biotina usando, por ejemplo, el conjugado estreptavidina-Alexa647 y se escanea usando procedimientos de barrido convencionales. Las intensidades en la imagen de cada mancha sobre la matriz son proporcionales a la abundancia del correspondiente miR en la muestra del paciente.

El uso de la matriz tiene varias ventajas para la detección de la expresión de miARN. En primer lugar, la expresión global de varios cientos de genes se puede identificar en la misma muestra en un punto de tiempo. En segundo lugar, mediante un diseño cuidadoso de las sondas oligonucleotídicas, se puede identificar la expresión de moléculas tanto maduras como precursoras. En tercer lugar, en comparación con el análisis de transferencia Northern, el chip requiere una cantidad pequeña de ARN y proporciona resultados reproducibles usando 2,5 µg de AR total. El número relativamente limitado de miARN (unos pocos cientos por especie) permite la construcción de una micromatriz común para varias especies, con distintas sondas oligonucleotídicas para cada uno. Dicha herramienta permitiría el análisis de la expresión de especies trans para cada miR conocido en varias condiciones.

Además del uso para ensayos del nivel de expresión cuantitativos de miR específicos, se puede usar un microchip que contiene sondas oligonucleotídicas específicas de miARN correspondiente a una porción considerable del miRNoma, preferentemente todo el miRNoma, para llevar a cabo el perfil de expresión del gen miR, para analizar el patrón de expresión de miR. Distintas formas de miR se pueden asociar con marcadores de enfermedad establecidos, o directamente con un estado de enfermedad.

De acuerdo con los procedimientos de perfil de expresión descritos en el presente documento, el ARN total de una muestra de un sujeto que se sospecha que tiene cáncer (p. ej., LLC) se somete a transcripción inversa cuantitativa para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementarios al ARN en la muestra. Después, los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan con una micromatriz que comprenden sondas oligonucleotídicas específicas de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra. El resultado es un perfil de hibridación para la muestra que representa el patrón de expresión de miARN en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal de una unión de los oligodesoxinucleótidos diana de la muestra a las sondas oligonucleotídicas específicas de miARN en la micromatriz. El perfil se puede registrar como la presencia o ausencia de unión (señal frente a señal cero). Más preferentemente, el perfil registrado incluye la intensidad de la señal de cada hibridación. El perfil se compara con el perfil de hibridación generado de la muestra control normal, es decir no cancerosa. Una alteración en la señal es indicativa de la presencia de cáncer en el sujeto.

Otras técnicas para medir la expresión del gen miR también entran dentro de la experiencia en la técnica e incluyen varias técnicas para medir los índices de transcripción y degradación del ARN.

La invención también proporciona procedimientos de diagnóstico de una LLC asociada con uno o más marcadores pronósticos, que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo de LLC de un sujeto y comparar el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo de LLC con el nivel de un correspondiente producto génico de miR de una muestra control. Una alteración (p. ej., un incremento o una disminución) en la señal del al menos un miARN en la muestra de ensayo respecto a la muestra control es indicativa del sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, LLC asociada con uno o más marcadores pronóstico.

La LLC se puede asociar con uno o más marcadores o características pronóstico, incluidos, un marcador asociado con un pronóstico adverso (es decir, negativo) o un marcador asociado con un pronóstico bueno (es decir, positivo). En ciertas realizaciones, la LLC que se diagnostica usando los procedimientos descritos en el presente documento está asociada con una o más características pronósticas adversas.

MicroARN concretos cuya expresión está alterada en las células de LLC asociadas con cada uno de estos marcadores pronósticos se describen en el presente documento. En una realización, el nivel del al menos un producto génico de miR se mide mediante transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende sondas oligonucleotídicas específicas del miARN, para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y, comparación del perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos de miR en las células puede tener como resultado la alteración de la regulación de una o más dianas previstas para estos miR, que puede conducir a la formación de LLC. Por tanto, alterar el nivel del producto génico de miR (p. ej., disminuyendo el nivel de un miR que se regula por aumento, en las células LLC, incrementando el nivel de un miR que se regula mediante disminución en las células cancerosas) pueden tratar con éxito la LLC. Ejemplos de genes diana putativos para los miARN cuya alteración está alterada en las células de LLC se describen en el presente documento.

De acuerdo con esto, la presente invención abarca procedimientos de tratar la LLC en un sujeto, en los que la regulación de la señal del al menos un producto génico de miR está alterada (p. ej., regulada por disminución,

regulada por aumento) en las células cancerosas del sujeto. Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado por disminución en las células cancerosas, el procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR aislado, de modo que la proliferación de las células cancerosas en el sujeto está inhibida. Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado por aumento en las células cancerosas, el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR, denominado en el presente documento

5 compuestos de inhibición de la expresión del gen de miR, de modo que la proliferación de las células cancerosas en el sujeto está inhibida.

10 Los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refieren a aliviar los síntomas asociados con una enfermedad o afección, por ejemplo, LCC, incluido prevenir o retrasar el inicio de los síntomas de la enfermedad y/o atenuar la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad o afección. Los términos, “sujeto” e “individuo”, como se define en el presente documento, incluyen, entre otros, primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedores o murinas. En una realización preferida, el animal es un ser humano.

15 Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un producto génico de miR aislado es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que sufre LLC. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un producto génico de miR que se ha de administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores tales como el tamaño y el peso del sujeto, la extensión de la penetración de la enfermedad, la edad, la salud y el sexo del sujeto, la vía de administración y si la administración es regional o sistémica.

20 Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto que se va a tratar. Preferentemente, dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o enteral, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado administrada a un sujeto puede variar de aproximadamente 5-3.000 microgramos/kg de peso corporal, de aproximadamente 700-1.000 microgramos/kg de peso corporal o mayor que aproximadamente 1.000 microgramos/kg de peso corporal.

25 Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un régimen de dosificación adecuado para la administración de un producto génico de miR aislado a un sujeto dado. Por ejemplo, un producto génico de miR se puede administrar al sujeto una vez (p. ej., en forma de una única inyección o depósito). Como alternativa, un producto génico de miR se puede administrar a un sujeto una o dos veces al día durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más particularmente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación concreto, un producto génico de miR se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz del producto génico de miR administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de producto génico de administrado durante todo el régimen de dosificación.

30 Como se usa en el presente documento, un producto génico de miR “aislado” es uno que se sintetiza o altera o elimina del estado natural mediante intervención humana. Por ejemplo, un producto génico de miR sintético, o un producto génico de miR parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural, se considera “aislado”. Un producto génico de miR aislado puede existir en forma purificada sustancialmente o puede existir en una célula en la que se ha liberado el producto génico de miR. Por tanto, producto génico de miR que se libera deliberadamente en una célula, o se expresa en ella, se considera un producto génico de miR aislado. Un , producto génico de miR producido dentro de una célula a partir de una molécula precursora de miR también se considera una molécula “aislada”.

35 40 Los productos génicos de miR aislados se pueden obtener usando una serie de técnicas estándar. Por ejemplo, los productos génicos de miR se pueden sintetizar químicamente o producir de forma recombinante usando procedimientos conocidos en la técnica. En una realización, los productos génicos de miR se sintetizan químicamente usando fosfoamiditas ribonucleosídicas protegidas y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los suministradores comerciales de moléculas de ARN sintéticas o reactivos de síntesis incluyen, por ejemplo, Prologo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE.UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE.UU.), Gien Research (Sterling, VA, EE.UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE.UU.) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido).

45 50 Como alternativa, los productos génicos de miR se pueden expresar de plásmidos recombinantes de ADN circular o lineal usando cualquier promotor adecuado. Promotores adecuados para expresar el ARN de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras de U6 o de H1 ARN polo III o los promotores del citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia en la técnica. Los plásmidos recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos de miR en células cancerosas. Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes se pueden aislar de sistemas de expresión de células cultivadas mediante técnicas estándar. Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes también se pueden liberar en las

células cancerosas y expresarse directamente en ellas. El uso de plásmidos recombinantes para liberar los productos génicos de miR en las células cancerosas se trata con mayor detalle más adelante.

5 Los productos génicos de miR se pueden expresar a partir de un plásmido recombinante distinto o se pueden expresar a partir del mismo plásmido recombinante. En una realización, los productos génicos de miR se expresan como moléculas precursoras de ARN a partir de un único plásmido y las moléculas precursoras se procesan en el producto génico de miR funcional mediante un sistema de procesamiento adecuado, incluidos, entre otros, sistemas de procesamiento existente dentro de una célula cancerosa. Otros sistemas de procesamiento incluyen por ejemplo, el sistema de lisado celular *in vitro* de *Drosophila* (p. ej., como se describe en la solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 2002/0086356 concedida a Tuschl y col. y el sistema de ARNasa III de *E. coli* (p. ej., como se describe en la solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 2004/0014113 concedida a Yang y col.,

15 La selección de plásmidos adecuados para expresar los productos génicos de miR, procedimientos para insertar secuencias de ácido nucleico en el plásmido para expresar los productos génicos y procedimientos para liberar el plásmido recombinante en las células de interés están dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Zeng y col. (2002), *Molecular Cell* 9:1327-1333; Tuschl (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:446-448; Brummelkamp y col. (2002), *Science* 296:550-553; Miyagishi y col. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:497-500; Paddison y col. (2002), *Genes Dev.* 16:948-958; Lee y col. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:500-505; y Paul y col. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:505-508.

20 En una realización, un plásmido que expresa los productos génicos de miR comprende una secuencia que codifica un ARN precursor de miR bajo el control del promotor intermedio-temprano de CMV. Como se usa en el presente documento, "bajo el control" se un promotor significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican el producto génico de miR se localizan en 3' del promotor, de modo que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias codificadoras del producto génico de miR.

25 Los productos génicos de miR también se pueden expresar en vectores virales recombinantes. Se contempla que los productos génicos de miR puedan expresarse en dos vectores virales recombinantes distintos o en el mismo vector viral. El ARN expresado en vectores virales recombinantes puede aislarse de sistemas de expresión en células cultivadas mediante técnicas estándar o se pueden expresar directamente en células cancerosas. El uso de plásmidos recombinantes para liberar los productos génicos de miR en las células cancerosas se trata con mayor detalle más adelante.

30 Los vectores virales recombinantes de la invención comprenden secuencias que codifican los productos génicos de miR y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias de ARN. Promotores adecuados incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras de U6 o H1 ARN pol III o los promotores del citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia en la técnica. Los vectores virales recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos de miR en una célula cancerosa.

40 Se puede usar cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias de codificación para los productos génicos de miR; por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (p. ej., lentivirus (LV), rabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores virales se puede modificar mediante seudotipado de los vectores con proteínas de la cubierta u otros antígenos de superficie de otros virus o sustituyendo diferentes proteínas de la cápside viral, según sea adecuado.

45 Por ejemplo, los vectores lentivirus de la invención se pueden seudotipar con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), de la rabia, Ébola, Mokola y similares. Los vectores AAV de la invención pueden fabricarse para dirigirlos a células diferentes sometiendo a ingeniería a los vectores para que expresen diferentes serotipos de la proteína de la cápside. Por ejemplo, un vector AAV que expresa una cápside del serotipo 2 en un genoma del serotipo 2 se denomina AAV 2/2. Este gen de la cápside de serotipo 2 en el vector AAV 2/2 se puede reemplazar con un gen de la cápside de serotipo 5 para producir un vector AAV 2/5. Las técnicas para construir vectores AAV que expresan diferentes serotipos de la proteína de la cápside están dentro de la experiencia en la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz, J.E., y col. (2002), *J. Virol.* 76:791-801.

50 La selección de vectores virales recombinantes adecuados para usar en la invención, procedimientos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar ARN en el vector, procedimientos para liberar el vector viral a las células de interés y recuperación de los productos de ARN expresados están dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg (1995), *Gene Therap.* 2:301-310; Eglitis (1988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller (1990), *Hum. Gene Therap.* 1:5-14; y Anderson (1998), *Nature* 392:25-30.

60 Vectores virales particularmente adecuados son los derivados de AV y AAV. Un vector AV adecuado para expresar los productos génicos de miR, un procedimiento para construir el vector AV recombinante y un procedimiento para liberar el vector en células diana, se describen en Xia y col. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010. Vectores AAV adecuados para expresar los productos génicos de miR, procedimientos para construir el vector AAV recombinante y procedimientos para liberar los vectores en las células diana, se describen en Samulski y col. (1987), *J. Virol.* 61 :3096-3101; Fisher y col. (1996), *J. Virol.*, 70:520-532; Samulski y col. (1989), *J. Virol.* 63:3822-3826; la patente de

EE.UU. nº 5.252.479; la patente de EE.UU. nº 5.139.941; la solicitud de patente internacional nº WO 94/13788; y la solicitud de patente internacional nº WO 93/24641. En una realización, los productos génicos de miR se expresan a partir de un único vector AAV recombinante que comprende el promotor intermedio-temprano del CMV.

5 En una realización concreta, un vector viral AAV recombinante de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor de miR en conexión operable con una secuencia de terminación de poli T bajo el control de un promotor U6 de ARN humano. Como se usa en el presente documento, "en conexión operable con una secuencia de terminación poli T" significa que las secuencias de ácido nucleico que codifica las hebras sentido o antisentido están inmediatamente adyacentes a la señal de terminación polo T en dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias miR del vector, las señales de terminación poli T actúan finalizando la transcripción.

10 En otras realizaciones de los procedimientos de tratamiento de la invención, también se puede administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto que inhibe la expresión de miR. Como se usa en el presente documento, "inhibir la expresión de miR" significa que la producción de la forma activa, madura del producto génico de miR tras el tratamiento es inferior a la cantidad producida antes del tratamiento. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente si la expresión de miR se ha inhibido en una célula cancerosa usando, por ejemplo, las técnicas para determinar el nivel de transcritos de miR tratadas anteriormente para el procedimiento diagnóstico. La inhibición se puede producir a nivel de la expresión génica (es decir, inhibiendo la transcripción de un gen miR que codifica el producto génico miR) o a nivel del procesamiento (p. ej., inhibiendo el procesamiento de un precursor de miR en un miR maduro activo).

15 Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un compuesto que inhibe la expresión de miR es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que sufre un cáncer asociado con una característica cromosómica asociada a cáncer. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión de miR que se ha de administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores tales como el tamaño y el peso del sujeto, la extensión de la penetración de la enfermedad, la edad, la salud y el sexo del sujeto, la vía de administración y si la administración es regional o sistémica.

20 Por ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto que inhibe la expresión se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto que se va a tratar. Dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o enteral, entre otras, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto que inhibe la expresión administrada a un sujeto puede variar de aproximadamente 5-3.000 microgramos/kg de peso corporal, de aproximadamente 700-1.000 microgramos/kg de peso corporal o mayor que aproximadamente 1.000 microgramos/kg de peso corporal.

25 Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación adecuado para la administración de un compuesto que inhibe la expresión de miR aislado a un sujeto dado. Por ejemplo, un compuesto que inhibe la expresión se puede administrar al sujeto una vez (p. ej., en forma de una única inyección o depósito). Como alternativa, un compuesto que inhibe la expresión se puede administrar a un sujeto una o dos veces al día durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más preferentemente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación concreto, un compuesto que inhibe la expresión se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz del compuesto que inhibe la expresión administrada al sujeto puede comprender la cantidad total del compuesto administrado durante todo el régimen de dosificación.

30 Compuestos adecuados para inhibir la expresión del gen miR incluyen ARN bicatenario (tal como un ARN de interferencia corto o pequeño o "siARN", ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimáticas, tales como ribozimas. Cada uno de estos compuestos puede dirigirse a un producto génico de miR dado y destruir o inducir la destrucción del producto génico de miR diana.

35 Por ejemplo, la expresión de un gen miR dado se puede inhibir induciendo ARN de interferencia del gen miR con una molécula de ARN bicatenario aislado ("dsARN") que tiene al menos un 90 %, por ejemplo al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de homología de secuencia con al menos una porción del producto génico de miR. En una realización concreta, la molécula de dsARN es un "ARN de interferencia corto o pequeño" o "siARN".

40 El siARN útil en los presentes procedimientos comprenden ADN bicatenario corto de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El siARN comprende una hebra de ARN sentido y una hebra de ARN antisentido complementaria hibridado junto con interacciones de apareamiento de bases de Watson y Crick convencionales (en lo sucesivo en el presente documento "con apareamiento de bases"). La hebra sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ácido nucleico contenida dentro del producto génico de miR diana.

45 Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico en un siARN que es "sustancialmente

idéntica" a una secuencia diana contenida dentro del ARNm diana es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana o que difiere de la secuencia diana en uno o dos nucleótidos. Las hebras sentido y antisentido del siARN pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenarios complementarios o pueden comprender una única molécula en la que las dos porciones complementarias están apareadas sus bases y están unidas covalentemente mediante un área "en horquilla" monocatenaria.

El siARN también puede ser ARN alterado que difiere del ARN natural en la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones puede incluir la adición de material no nucleotídico, tal como en el(los) extremo(s) del siARN o a uno o más nucleótidos internos del siARN, o modificaciones que hacen el siARN resistente a la digestión con nucleasa, o la sustitución de uno o más nucleótidos en el siARN con desoxirribonucleótidos.

Una o ambas hebras del siARN pueden también comprender un saliente en 3'. Como se usa en el presente documento, un "saliente en 3'" se refiere a al menos un nucleótido desapareado que se extiende desde el extremo 3' de una hebra de ARN dúplex. Por tanto, en ciertas realizaciones, el siARN comprende al menos un saliente en 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En una realización concreta, el saliente en 3' está presente en ambas hebras del siARN y tiene 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra del siARN puede comprender salientes en 3' de ácido ditimidílico ("TT") o de ácido diuridílico ("uu").

El siARN se puede producir química o biológicamente, o se puede expresar en un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito antes para los productos génicos de miR aislados. Ejemplos de procedimientos para producir y analizar las moléculas de dsARN o siARN se describen en la solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 2002/0173478 a Gewirtz y la solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 2004/0018176 a Reich y col.

La expresión de un gen miR dado también se puede inhibir mediante un ácido nucleico antisentido. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une al ARN diana por medio de interacciones de ácido nucleico ARN-ARN o ARN-ADN o ARN-péptido, que altera la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos antisentido adecuados para usar en los presentes procedimientos son ácidos nucleicos monocatenarios (p. ej., ARN, ADN, quimeras ARN-ADN, PNA) que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria a una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es un 50-100 % complementaria, 75-100% complementaria o 95-100 % complementaria con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. Las secuencias de ácido nucleico para los productos génicos de miR se proporcionan en el presente documento. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los ácidos nucleicos antisentido activan la ARNasa H u otra nucleasa celular que digiere el dúplex producto génico de miR/ácido nucleico antisentido.

Ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones en la estructura del ácido nucleico o en los restos azúcar y base (o su equivalente) para potenciar la especificidad por la diana, la resistencia a nucleasa, la liberación u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Dichas modificaciones incluyen restos de colesterol, intercalantes de dúplex, tales como acridina, o uno o más grupos de resistencia a nucleasa.

Los ácidos nucleicos antisentido se pueden producir química o biológicamente, o se puede expresar en un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito antes para los productos génicos de miR aislados. Ejemplos de procedimientos para producir y analizar están dentro de la experiencia en la técnica, véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), Science 261:1004 y la patente de EE.UU. nº 5.849.902 a Woolf y col.

La expresión de un gen miR dado también se puede inhibir mediante un ácido nucleico enzimático. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión al sustrato que tiene complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contiguo de un producto génico de miR y que es capaz de escindir específicamente el producto génico de miR. La región de unión al sustrato del ácido nucleico enzimático puede ser, por ejemplo, 50-100 % complementaria, 75-100% complementaria o 95-100 % complementaria con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. Los ácidos nucleicos enzimáticos también pueden comprender modificaciones en los grupos de bases, azúcar y/o fosfatos. Un ejemplo de ácido nucleico enzimático para usar en los presentes procedimientos es una ribozima.

Los ácidos nucleicos enzimáticos se pueden producir química o biológicamente, o se puede expresar en un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito antes para los productos génicos de miR aislados. Ejemplos de procedimientos para producir y analizar moléculas de dsARN o si ARN se describen en Werner y Uhlenbeck (1995), Nucl. Acids Res. 23:2092-96; Hammann y col. (1999), Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9:25-31; y la patente de EE.UU. nº 4.987.071 a Cech y col.

La administración de al menos un producto génico de miR, o al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR, inhibirá la proliferación de células cancerosas en un sujeto que tiene un cáncer asociado con una característica

5 cromosómica asociada con cáncer. Como se usa en el presente documento, “inhibir la proliferación de un célula cancerosa” significa matar la célula o detener o ralentizar de forma permanente o temporal el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación de células cancerosas se puede deducir si el número de dichas células en el sujeto permanece constante o disminuye tras la administración de los productos génicos de miR o de compuestos  
 5 inhibidores de la expresión del gen miR. Una inhibición de la proliferación de células cancerosas también se puede deducir si el número absoluto de dichas células aumenta, pero la tasa de crecimiento tumoral disminuye.

10 El número de células cancerosas en el cuerpo de un sujeto se puede determinar mediante medición directa o mediante la estimación a partir del tamaño de las masas tumorales primarias o metastásicas. Por ejemplo, el número de células cancerosas en un sujeto se puede medir mediante procedimientos inmunohistológicos, citometría de flujo u otras técnicas diseñadas para detectar marcadores de superficie característicos de las células cancerosas.

15 Los productos génicos de miR o los compuestos inhibidores de la expresión del gen miR se pueden administrar a un sujeto por cualquier medio adecuado para liberar estos compuestos en las células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos de miR o los compuestos inhibidores de la expresión de miR se pueden administrar mediante procedimientos adecuados para transfeccionar células del sujeto con estos compuestos o con ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican estos compuestos. En una realización, las células se transfeccionaron con un plásmico o vector viral que comprende secuencias que codifican al menos un producto  
 20 génico de miR o un compuestos inhibidor de la expresión del gen miR.

25 Los procedimientos de transfección para células eucariotas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de de una célula; electroporación; transferencia por liposomas o transferencia mediada por materiales lipófilos; liberación de ácido nucleico mediado por receptores, aceleración biobalística o de partículas; precipitación en fosfato cálcico y transfección mediada por vectores virales.

30 Por ejemplo, las células se pueden transfeccionar con un compuesto de transferencia liposómica, por ejemplo DOTAP metilsulfato de (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio, Boehringer - Mannheim) o un equivalente, tal como LIPOFECTINA. La cantidad de ácido nucleico usado no es crucial para la práctica de la invención; se pueden conseguir resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico/10<sup>5</sup> células. Por ejemplo, se puede usar una proporción de aproximadamente 0,5 microgramos del vector plasmídico en 3 microgramos de DOTAP por 10<sup>5</sup> células.

35 Un producto génico de miR o un compuesto inhibidor de la expresión del gen miR también se puede administrar a un sujeto mediante cualquier vía de administración enteral o parenteral adecuada. Las vías de administración enteral adecuadas para los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, liberación oral, rectal o intranasal. Vías de administración parenteral adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (p. ej., inyección en bolo intravenoso, infusión intravenosa, inyección en bolo intraarterial, infusión intraarterial e instilación con catéter en la vasculatura); inyección pero e intratisular (p. ej., inyección peritumoral e inyección intratumoral, inyección intraretiniana o inyección subretiniana); inyección o depósito subcutáneo, incluida infusión subcutánea (tal como mediante bombas osmóticas); aplicación directa en el tejido de interés, por ejemplo mediante un catéter u otro dispositivo de colocación (p. ej., una pastilla o un supositorio o un implante retiniano, que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Vías de administración particularmente adecuadas son inyección, infusión y administración intravenosa en el paciente.

45 En los presentes procedimientos, un producto génico de miR o un compuesto inhibidor de la expresión del producto génico de miR se pueden administrar al sujeto bien como ARN desnudo, en combinación con un reactivo de liberación o como un ácido nucleico (p. ej., un plásmido recombinante o un vector viral), que comprende secuencias que expresan el producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión. Reactivos de liberación adecuados incluyen, por ejemplo, reactivo lipófilo MirusTransit TKO; lipofectaina; lipofectamina, celfectina, policationes (p. ej.,  
 50 polilisina) y liposomas.

55 En el presente documento se tratan plásmidos recombinantes y vectores virales que comprenden secuencias que expresan los productos génicos de miR o compuestos inhibidores de la expresión del gen miR y técnicas para liberar dichos plásmidos y vectores en células cancerosas.

60 En una realización concreta, se usan liposomas para liberar en un sujeto un producto génico de miR o compuesto inhibidor de gen miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican). Los liposomas pueden incrementar la semivida en sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos. Liposomas adecuados para usar en la invención se pueden formar a partir de lípidos formadores de vesículas estándar, que, en general, incluyen fosfolípidos neutros o con carga negativa y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos está guiada en general por la consideración de factores, tales como el tamaño deseado del liposoma y la semivida de los liposomas en la circulación sanguínea. Se conocen diversos procedimientos para preparar liposomas, tal como se describe en, por ejemplo, Szoka y col. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467; y las patentes de EE.UU. n° 4.235.871. 4.501.728. 4.837.028 y 5.019.369.

65 Los liposomas para usar en los presentes procedimientos pueden comprender una molécula ligando que dirige el

liposoma a las células cancerosas. Se prefieren los ligandos que se unen a receptores prevalentes en las células cancerosas, como los anticuerpos monoclonales que se unen a los antígenos de células tumorales.

5 Los liposomas para usar en los presentes procedimientos también se pueden modificar de modo que se evite su eliminación por el sistema de macrófagos mononucleares ("SMM") y el sistema reticuloendotelial ("RES"). Dichos liposomas modificados tienen restos de opsonización-inhibición sobre la superficie o incorporarlos en la estructura del liposoma. En una realización particularmente preferida, un liposoma de la invención puede comprender tanto restos de opsonización-inhibición como un ligando.

10 Los restos de inhibición de la opsonización para usar en la preparación de los liposomas de la invención son, habitualmente, polímeros hidrófilos grandes que están unidos a la membrana del liposoma. Como se usa en el presente documento, un resto de inhibición de la opsonización está "unido" a la membrana de un liposoma cuando está química o físicamente unido a la membrana, por ejemplo mediante intercalado de un ancla soluble en lípidos en la propia membrana o mediante unión directa a grupos activos de los lípidos de la membrana. Estos polímeros hidrófilos de inhibición de la opsonización forman una capa de superficie protectora que disminuye significativamente la captación de los liposomas por el SMM y el RES, por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.920.016.

20 Los restos de inhibición de la opsonización adecuados para modificar los liposomas son, preferentemente, polímeros hidrosolubles con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 500 a 40.000 dalton y, más preferentemente, de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 dalton. Dichos polímeros incluyen derivados de polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG), por ejemplo metoxi PEG o PPG, y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poliácridamida o poli-N-vinilpirrolidona; poliamidoaminas lineales, ramificadas o dendrímicas; ácidos poliácridílicos; polialcoholes, por ejemplo alcohol polivinílico y polixilitol a los que los grupos carboxílico o amino está químicamente unidos, así como gangliósidos, tal como el gangliósido GM1. Los copolímeros de PEG, metoxi PEG o metoxi PPG o derivados de los mismos también son adecuados. Además, el polímero de inhibición de la opsonización puede ser un copolímero de bloque de PEG y un ácido poliamino, polisacárido, poliamidoamina, polietilenamina o polinucleótido. Los polímeros de inhibición de la opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péctico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenina; polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo que han reaccionado con derivados de ácidos carbónicos con la unión resultante de grupos carboxílicos. Preferentemente, el resto de inhibición de la opsonización es un PEG, PPG o derivados de los mismos. En ocasiones, los liposomas modificados con PEG o derivados de PEG se denominan "liposomas PEGilados".

40 El resto de inhibición de la opsonización puede estar unido a la membrana del liposoma mediante una cualquiera de las numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG se puede unir a un ancla liposoluble de fosfatidiletanolamina y, después, se puede unir a una membrana. De forma similar, un polímero de dextrano se puede derivar con un ancla liposoluble de estearilamina mediante aminación reductora usando  $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$  y una mezcla de disolventes, tal como tetrahidrofurano y agua en una proporción de 30:12 a 60 °C.

45 Los liposomas modificados con restos de inhibición de la opsonización permanecen en la circulación mucho más tiempo que los liposomas no modificados. Por este motivo, dichos liposomas se denominan, en ocasiones, liposomas "encubiertos". Se sabe que los liposomas encubiertos se acumulan en los tejidos alimentados por microvasculatura porosa o "con fugas". Por tanto, el tejido caracterizado por dichos defectos de la microvasculatura, por ejemplo los tumores sólidos, acumulan de forma eficiente estos liposomas; véase Gabizon y col. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18:6949-53. Además, la captación reducida por el RES disminuye la toxicidad de los liposomas encubiertos impidiendo la acumulación significativa de los liposomas en el hígado y el bazo. Por tanto, los liposomas que se modifican con restos de inhibición de la opsonización sin particularmente adecuados para liberar los productos génicos de miR o compuestos inhibidores de la expresión del gen miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) en las células tumorales.

55 Los productos génicos de miR o compuestos inhibidores de la expresión de miR se pueden formular como composiciones farmacéuticas, en ocasiones denominadas "medicamentos" antes de administrarlas a un sujeto de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia. De acuerdo con esto, la invención abarca composiciones farmacéuticas para tratar la LLC. En otra realización, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR aislado compuesto inhibidor de la expresión de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización concreta, el al menos un producto génico de miR corresponde a un producto génico de miR que tiene un menor nivel de expresión en las células de LLC-B respecto a las células control adecuadas. En ciertas realizaciones, el producto génico de miR aislado se selecciona del grupo constituido por miR-29 o miR-181 y combinaciones de los mismos.

65 En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un compuesto inhibidor de la expresión de miR. En una realización concreta, el al menos compuesto inhibidor de la expresión del gen miR es específico de un gen miR cuya expresión es superior en las células de LLC que en las células control.

En ciertas realizaciones, el compuesto inhibidor de la expresión del gen miR es específico de uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR29 o miR-181 y combinaciones de los mismos.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se caracterizan como ser al menos estériles y apirógenas. Como se usa en el presente documento, "formulaciones farmacéuticas" incluyen formulaciones para uso humano y veterinario. Los procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención están dentro de la experiencia en la técnica, como se describe en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa (1985).

10 Las presentes formulaciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) (p. ej., den 0,1 a 90 % en peso) o una sal fisiológicamente aceptable de los mismos, mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden también comprender al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) que están encapsuladas por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Vehículos farmacéuticamente aceptables especialmente adecuados son agua, agua tamponada, solución salina normal, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, ácido hialurónico y similares.

25 En una realización concreta, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también comprender al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) que es resistente a la degradación por nucleasas. Un experto en la técnica puede sintetizar fácilmente ácidos nucleicos que son resistentes a nucleasa, incorporando, por ejemplo, uno o más ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' en los productos génicos de miR. Ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' incluyen los modificados en la posición 2' con flúor, amino, alquilo, alcoxi y O-alilo.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizantes, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones y agentes de ajuste del pH. Aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente biocompatibles (p. ej., trometamina clorhidrato), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o bisamida-DTPA) o complejos de quelato cálcico (tal como, por ejemplo, DTPA cálcico, CaCaDTPA-bisamida) u, opcionalmente, adiciones de sales de calcio o de sodio (p. ej., cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden envasarse para usar en forma líquida o pueden estar liofilizadas.

40 Para las composiciones farmacéuticas sólidas de la invención se pueden usar vehículos convencionales no tóxicos sólidos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

45 Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes indicados anteriormente y 10-95 %, preferentemente 25 %-75 %, del al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican). Una composición farmacéutica para administración en aerosol (inhalación) puede comprender de 0,01-20 % en peso, preferentemente 1 %-10 % en peso, del al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión del gen miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican) encapsulados en un liposoma como se ha descrito anteriormente y un propelente. También se puede incluir un vehículo según se desee, por ejemplo lecitina para liberación intranasal. La invención también abarca procedimientos de identificación de un agente anti-LLC, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR en la célula. En una realización, el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con los menores niveles de expresión en las células de LLC. Un incremento del nivel del producto génico de miR en la célula, con respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-LLC. En una realización concreta, al menos un producto génico de miR asociado con una disminución de los niveles de expresión en las células de LLC se selecciona del grupo constituido por miR-29 o miR-181 y combinaciones de los mismos.

60 En otras realizaciones, el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con los mayores niveles de expresión en las células de LLC. Una disminución del nivel del producto génico de miR en la célula, con respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-LLC. En una realización concreta, al menos un producto génico de miR asociado con un incremento de los niveles de expresión en las células de LLC se selecciona del grupo constituido por miR-29 o miR-181 y combinaciones de los mismos.

65 Agentes adecuados incluyen, entre otros, fármacos (p. ej., moléculas pequeñas, péptidos) y macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos). El agente se puede producir de forma recombinante, sintética, o se

puede aislar (es decir, purificar) a partir de una fuente natural. Varios procedimientos para proporcionar dichos agentes a una célula (p. ej., transfección) son bien conocidos en la técnica y diversos de dichos procedimientos se han descrito anteriormente en el presente documento. Asimismo, en la técnica se conocen los procedimientos para detectar la expresión de al menos un producto génico de miR (p. ej., transferencia Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, perfil de la expresión).

A continuación se ilustrará la invención mediante los ejemplos no limitantes siguientes.

## Ejemplos

### Muestras de LLC y experimentos en microchip con microARN

Ochenta muestras de LLC se obtuvieron tras el consentimiento informado de los pacientes con diagnóstico de LLC en las instituciones del Research Consortium. Brevemente, se obtuvo sangre de pacientes con LLC, los linfocitos se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll/Hypaque (Amersham, Piscataway, NJ) y se procesaron para la extracción de ARN usando el procedimiento de Trizol estándar. La extracción de proteínas se llevó a cabo como se ha descrito previamente.<sup>10</sup> Los experimentos con microARN- microchip se realizaron como se ha descrito anteriormente.<sup>9</sup> Cada microchip de microARN contenía sondas por duplicado, que correspondían a 326 genes de microARN humanos y a 249 de ratón. El análisis estadísticos se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.<sup>11</sup> Para identificar microARN expresado de forma diferencial estadísticamente significativo se realizaron análisis de predicción de clase usando BRB ArrayTools.

### Construcciones de ADN, transfección, transferencia Western y ensayo de luciferasa

El ADNc de longitud completa del *TCL1* que incluía ADNc de las UTR en 5' y 3' se clonó en un vector pUSEamp (Upstate Biotechnology, Chicago, IL) (usado en la Fig. 1e). Los dúplex de ARN de *miR-29b* y *miR-181b* se adquirieron en Ambion (Austin, TX). Las transfecciones se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.<sup>12</sup> Las actividades luciferasa de luciérnaga y de renilla se analizaron con el sistema de ensayo doble de la luciferasa (Promega) y la actividad luciferasa de luciérnaga se normalizó con la actividad de luciferasa de renilla. Se realizaron preparaciones de lisado celular y análisis de transferencia Western usando anticuerpo monoclonal anti-*TCL1* (clon 27D6) como se ha descrito anteriormente.<sup>4</sup>

## Resultados y discusión

### La expresión alta de *Tcl1* se correlaciona con el fenotipo de la LLC-B agresiva

Para evaluar la expresión de *TCL1* y microARN en muestras de LLC-B se escogieron tres grupos de LLC-B: 23 muestras de LLC-B indolente, 25 muestras de LLC-B agresiva y 32 muestras de LLC-B agresiva con delección en 11q. En las Figuras 4a-4d se muestran descripciones detalladas de las muestras.

Los experimentos en microchip con microARN revelaron que tres grupos de LLC muestran significativas diferencias características en el patrón de expresión de microARN (véase la Figura 3, Tabla 1 y la Figura 5, Tabla 2).

Para determinar la expresión de la proteína *TCL1* en tres grupos de LLC se llevó a cabo análisis de transferencia Western usando el anticuerpo monoclonal 27D6 frente a *TCL1*. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 1a-b.

La expresión de *TCL1* se evaluó como baja, media, alta y muy alta. Los experimentos de los inventores revelaron niveles bajos en 15 de 26 (65 %) de LLC-B indolente, en 11 de 25 (44 %) de LLC-B agresiva y en 1 de 32 (3 %) de LLC-B agresiva con delecciones en 11q; mientras que se observó expresión alta y muy alta de *TCL1* en 1 de 23 (4 %) de LLC-B indolente, en 14 de 25 (56 %) de LLC-B agresiva y en 24 de 32 (75 %) de LLC-B agresiva con delecciones en 11q (Fig. 1b).

En el presente documento, el inventor cree que la sobreexpresión de *TCL1* se correlaciona con el fenotipo de LLC-B agresiva ( $p < 10^{-6}$ ) y con delecciones en 11q ( $p < 10^{-4}$ ). Los resultados son consistentes con el estudio recién publicado en el que se demuestra que la expresión alta de *TCL1* en la LLC humana se correlaciona con un estado de  $V_H$  sin mutar y positividad para ZAP70.<sup>5</sup>

### Expresión de *Tcl1* diana *MiR-29* y *miR-181*

Para determinar qué miARN(s) estaban dirigidos a *TCL1* se usó el software RNAhybrid ofrecido por Bielefeld University Bioinformatics Server y la base de datos miRBase.<sup>13</sup> Entre los candidatos a miR dirigidos a *TCL1* se encontró que *miR-29b* y *miR-181b* (Fig. 1c, otros diversos sitios con homología menor no se muestran) también estaban regulados por disminución en la LLC-B agresiva con delecciones en 11q (Fig. 3, Tabla 1).

La expresión de estos miR se confirmó mediante RT-PCR en tiempo real en un grupo representativo de muestras

(Fig. 4a-4d).

Además, previamente se ha demostrado que la expresión de miembros de la familia de miR-20 podría discriminar entre muestras de LLC con un pronóstico bueno y malo.<sup>9</sup> Después, se determinó si estos miR de verdad están dirigidos a la expresión de *TCL1* usando la UTR en 3' de *TCL1* en posición posterior al ORF de la luciferasa, como se ha descrito anteriormente.<sup>12</sup> Células HEK293 se co-transfeccionaron con *miR-29b* o control negativo *scramble*, como se ha indicado, y la construcción de pGL3 que contiene una parte del ADNc de *TCL1* que incluye una región homóloga a *miR-29* (*Tcl1*) o el vector pGL3 solo, tal como se ha indicado.

Para los ensayos con *miR-181* se insertó el ADNc de longitud completa de *TCL1* en el vector pGL3 en orientación sentido (*Tc11FL*) o antisentido (*Tc11FLAS*). La Fig. 1d muestra que la expresión del ARNm de *TCL1* está inhibida por *miR-29* y *miR-181*. Para confirmar estos hallazgos, el ADNc de *TCL1* de longitud completa que incluye UTR en 5' y 3' se clonaron en un vector de expresión de mamífero de CMV y se investigó si *miR-29b* y *miR181b* afectan a los niveles de expresión de la proteína *TCL1*. Los inventores co-transfeccionaron esta construcción con *miR-29b*, *miR-181b* y control negativo Pre-miR (*scramble*) en 293 células como se ha indicado en la Figura 1e.

Estos experimentos revelaron que la co-expresión de *TCL1* con *miR-29b* y *miR-181b* disminuía significativamente la expresión de *TCL1* (Fig. 1e, calle 2 frente a las calles 1 y 3).

Por tanto, en el presente documento se muestra que *miR-29b* y *miR-181b* apuntan a la expresión de *TCL1* a niveles de ARNm y de proteínas. Es interesante el hecho de que había una correlación inversa entre la expresión de *miR-29b* y *miR-181b* y la expresión de la proteína *TCL1* en muestras de LLC-B (Fig. 1f): Todas las muestras que muestran expresión elevada de *miR-29b* y *miR-181b* también muestran expresión baja o media de *TCL1*; todas las muestras que muestran expresión muy alta de *TCL1* muestran, en su mayoría, expresión baja de *miR-29b* y *miR-181b*. Estos resultados muestran que la expresión de *TCL1* en LLC está regulada, al menos en parte, por *miR-29* y *miR-181*.

En el presente documento se demuestra que la expresión de *TCL1* está regulada por *miR-29* y *miR-181*, y esta regulación es relevante para tres grupos de LLC-B estudiados. Aunque se observó una correlación inversa entre la expresión de la proteína *TCL1* y estos dos miR, una proporción significativa de las muestras de LLC-B muestra una expresión baja de *TCL1* y una expresión baja de *miR-29* y *miR-181* (Fig. 1f). Esto sugiere que en estas muestras, la expresión de *TCL1* está regulada por disminución transcripcionalmente o por otros miARN. El hecho de que ni *miR-29* ni *miR-181* está localizado en 11q sugiere que dicha región puede contener un regulador importante de la expresión de estos dos miR.

Es interesante el hecho de que *miR-181* se expresa de forma diferencial en células B y *TCL1* es, en su mayoría, un gen específico de células B.<sup>14</sup> Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el inventor cree, en el presente documento, que hay una correlación inversa entre la expresión de *TCL1* y *miR-181* en diferentes estadios de la maduración de las células B. Ya que *miR-29* y *miR-181* son inhibidores naturales de *TCL1*, estos miR pueden ser útiles candidatos para agentes terapéuticos en LLC-B que sobreexpresa *TCL1*.

De acuerdo con las condiciones de los estatutos de la patente, el principio y modo de operación de la presente invención se han explicado e ilustrado en su realización preferida. No obstante, debe entenderse que la presente invención se puede practicar, de otro modo, que como se explica e ilustra explícitamente sin desviarse de su espíritu o alcance.

## Referencias

1. Sgambati M, Linet M, Devesa S. Chronic lymphocytic leukemia, Epidemiological, Familial, and Genetic Aspects. Chronic lymphocytic leukemias, Segunda Edición, Revisada y Ampliada, Bruce Cheson, Ed 45 Marcel Dekker, Inc. New York. 200; 33-62.

2. Virgilio I, Narducci MG, Isobe M, y col. Identification of the *TCL1* gene involved in T-cell malignancies. Proc Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91 :12530-12534.

3. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, y col. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted *TCL1* expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99:6955-6960.

4. Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, y col. *Tcl1* enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 3028-3033.

5. Herling M, Patel KA, Khalili J, y col. *TCL1* shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. Leukemia. 2006; 20:280-285.

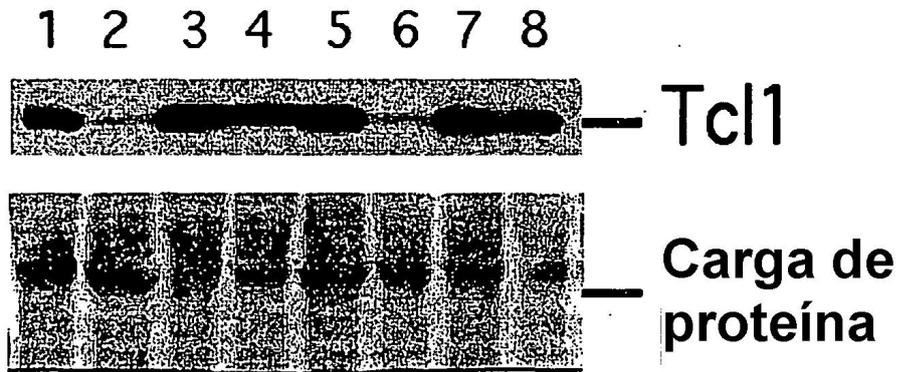
6. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, y col. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N. Engl. J. Med. 2000; 343: 1910-1916.

7. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004; 431 :350-355.
- 5 8. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, y col. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 11755-11760.
9. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, y col. A MicroRNA signature associate with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2005; 353:1793-1801.
- 10 10. Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Aqeilan RI, Croce CM, Pekarsky Y. Akt phosphorylates Tall oncoprotein and inhibits its repressor activity. *Cancer Res*. 2005; 65:4515-4519.
11. Volinia S, Calin GA, Liu CG, y col. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 25 103:2257-2261.
- 15 12. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, y coll. miR15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102: 13944-13949.
- 20 13. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34:D140-144.
14. Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, y col. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res*. 2005.

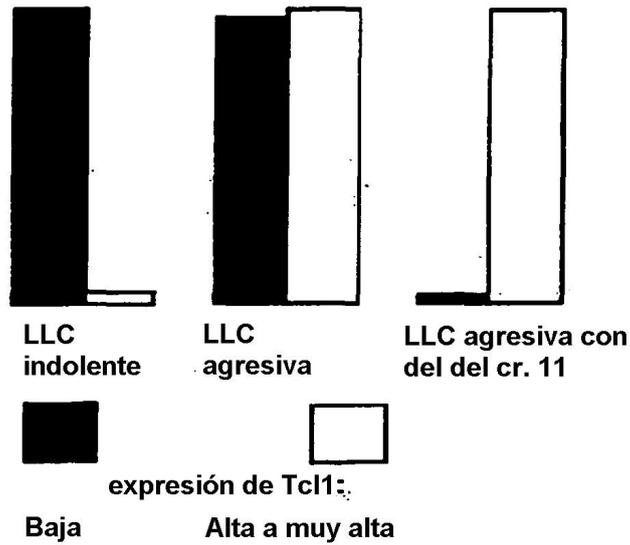
25

**REIVINDICACIONES**

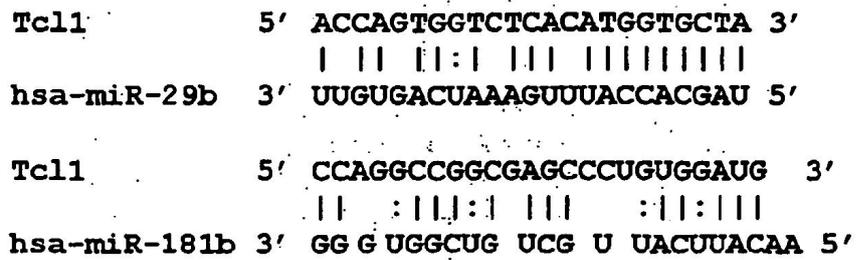
1. Un procedimiento de diagnóstico, tenga un sujeto, o esté en riesgo de desarrollar, leucemia linfocítica crónica (LLC-B), que comprende medir el nivel de al menos un producto génico de *miR-29b* y un producto génico de *miR-181b* en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en el que una disminución en el nivel del producto génico de *miR-209b* y una disminución en el nivel del producto génico de *miR-181b* en la muestra de ensayo, respecto al nivel del correspondiente producto génico de *miR-29b* y del producto génico de *miR-181b* en una muestra control es indicativo del sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, LLC-B.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel de los productos génicos de *miR-29b* y *miR-181b* se miden usando análisis de transferencia Northern.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel de al menos el producto génico de *miR-29b* y del producto génico de *miR-181b* se mide mediante un procedimiento que comprende:
- (1) transcripción inversa de ARN desde una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un grupo de oligodesoxinucleótidos diana;
  - (2) hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende sondas oligonucleotídicas específicas de miARN para al menos *miR-29b* y *miR-181b*, para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y
  - (3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control.
- en el que una disminución en la señal de al menos es indicativa del sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, LLC-B.
4. Una composición farmacéutica para tratar la LLC-B, que comprende al menos un producto génico de *miR-29n* aislado y un producto génico de *miR-181b* aislado, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Un procedimiento de identificación de un agente anti-LLC-B, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de *miR-29b* y un producto génico de *miR-181b* asociado con menores niveles de expresión en células de LLC-B, en el que un incremento del nivel del producto génico de *miR-19b* y del producto génico de *miR-181b* en la célula, respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anti-LLC-B.-{ }-



**Fig. 1a**



**Fig. 1b**



**Fig. 1c**

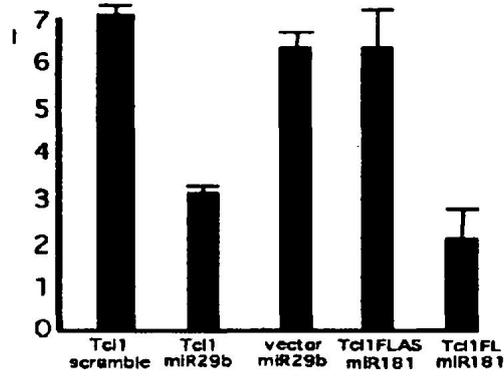


Fig. 1d

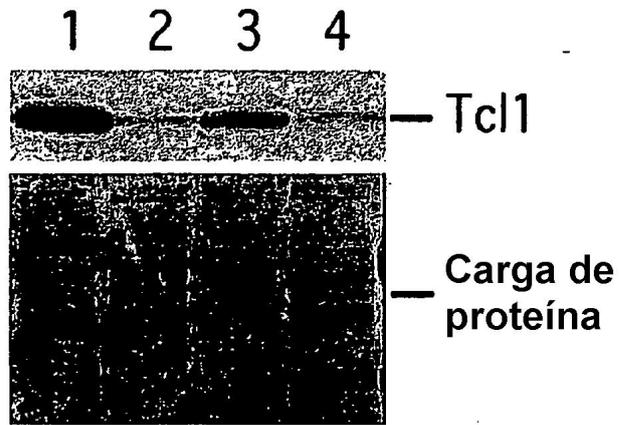


Fig. 1e

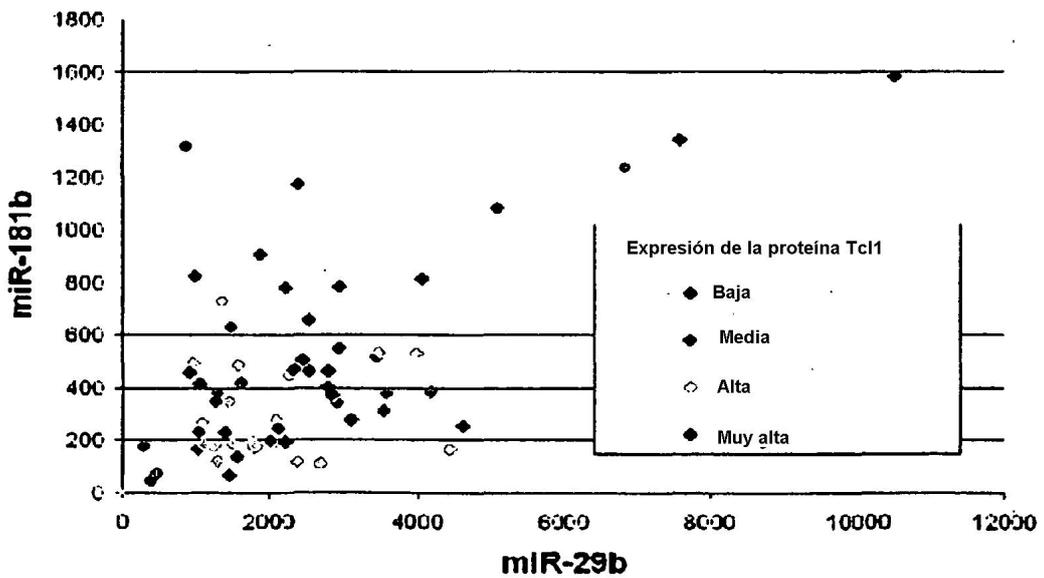


Fig. 1f

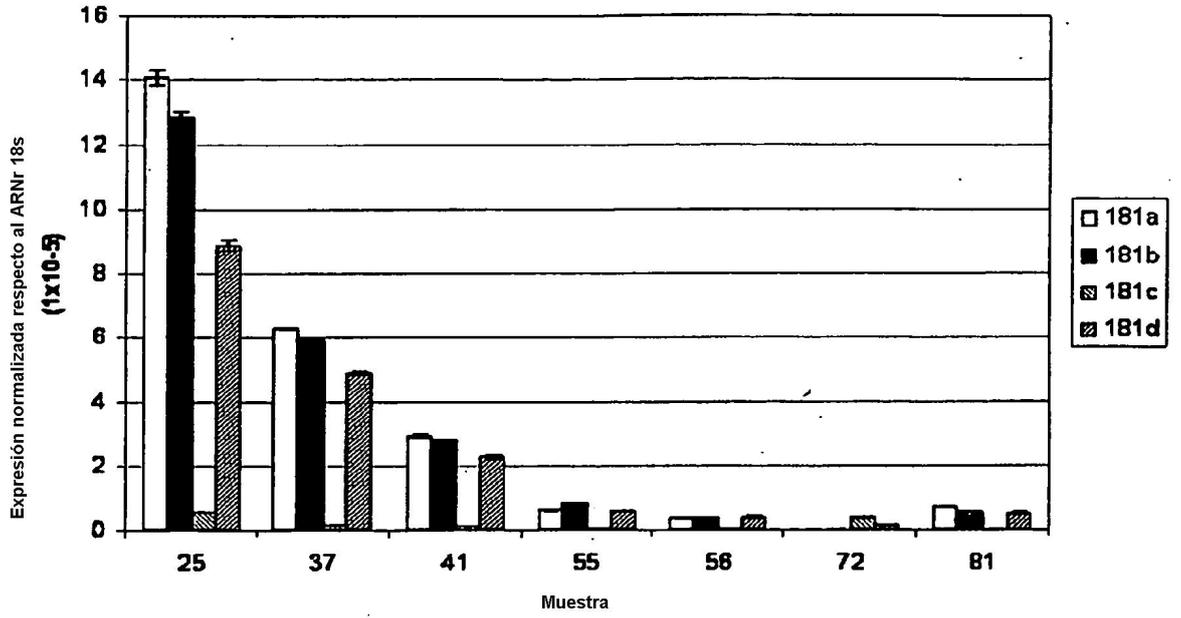


Fig. 2a

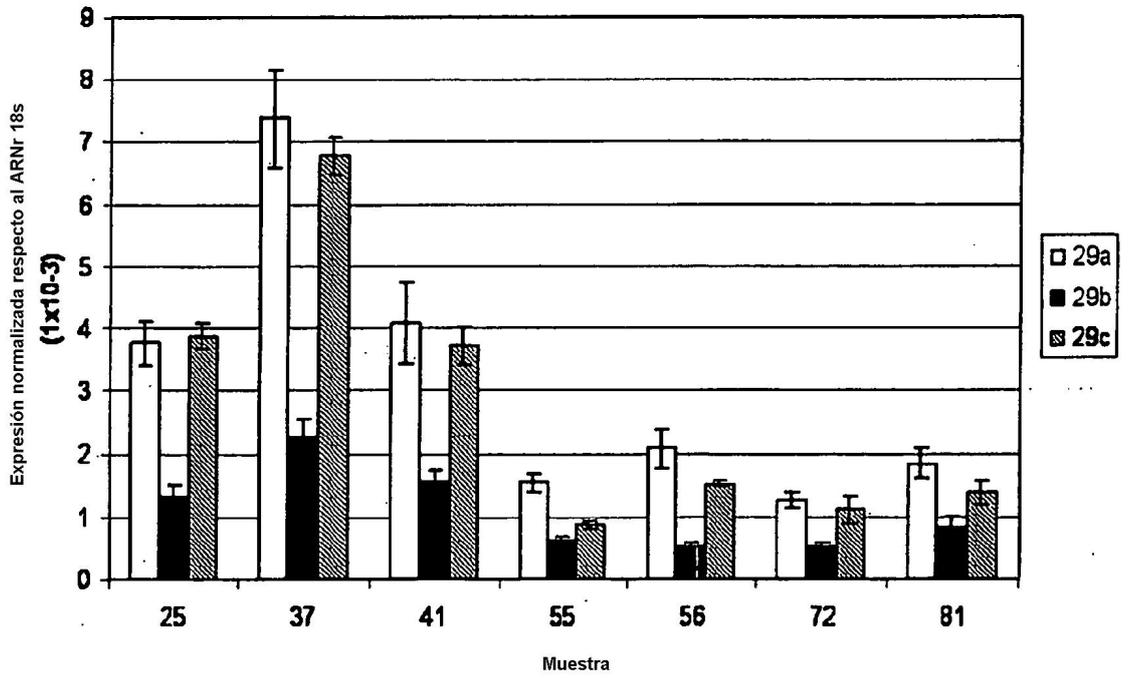


Fig. 2b

Tabla 1. MicroARN estadísticamente significativos que se diferencian en los subtipos de la LLC.					
MicroARN	Posición cromosómica	valor p	Cambio (agresiva crom. 11 normal/ indolente)	Cambio (agresiva crom.11 normal/ agr. deleción crom.11)	Cambio (argresiva deleción crom.11/ indolente)
miR-363	Xq26.2	<0.000001	1.69	3.15	0.54
miR-30a	6q13	0.000001	0.79	1.95	0.41
miR-19b-1	13q31.3	0.000004	0.92	1.91	0.48
miR-29c	1q32.2	0.000006	0.63	1.77	0.35
miR-146a	5q33.3	0.000044	2.02	3.26	0.62
miR-145	5q33.1	0.000054	0.81	1.21	0.67
miR-367	4q25	0.000081	1.07	2.05	0.52
miR-129-1	7q32.1	0.000082	1.15	1.40	0.82
miR-181c	19p13.12	0.000094	0.95	2.05	0.46
miR-191	3p21.31	0.000156	1.33	2.32	0.57
miR-29b-2	1q32.2	0.000175	0.64	1.47	0.44
miR-197	1p13.3	0.000255	0.96	1.38	0.69
miR-107	10q23.32	0.000298	1.13	1.97	0.58
miR-106a	Xq26.2	0.000345	1.02	1.91	0.53
miR-130b	22q11.21	0.000413	1.14	1.84	0.62
miR-320	8p21.3	0.000514	0.92	1.34	0.69
miR-215	1q41	0.000545	0.92	1.80	0.51
miR-342	14q32.2	0.000635	1.01	1.69	0.60
miR-93	7q22.1	0.000655	1.06	1.71	0.62
miR-15b	3q26.1	0.000672	1.12	2.10	0.53
miR-21	17q23.1	0.000686	1.14	2.06	0.55
miR-185	22q11.21	0.000695	1.47	1.62	0.91
miR-181a-1	1q31.3	0.000737	0.98	2.32	0.42
miR-140	16q22.1	0.000746	0.91	1.90	0.48
miR-181b-1	1q31.3	0.001647	1.04	1.99	0.52

Fig. 3

Información de la muestra de LLC

Indolente	VH<98	ZAP<20	Sin anomalías crom.
Agresiva	VH>98	ZAP>20	
Agresiva	VH>98	ZAP>20	11qdel FISH

**Fig. 4a**

LLC AGRESIVA			N=25
ID	CRC ID	% VH	% ZAP
1	IWF0001	100	70.1
2	IWF0047	99.6	71.5
3	IWF0195	100	86.8
4	IWF0187	100	71.3
5	JGG0325	100	75.2
82	JGG0376	98.6	65.2
7	KRR0012	100	78.1
8	KRR0062	99.3	57
9	KRR0075	99.3	50.1
10	MJK0011	99.6	67.4
11	MJK0451	99.3	74.4
12	MJK0500	99.3	92.2
13	MJK0587	100	67.7
14	MJK0588	100	76.5
15	MJK0607	100	77.7
16	MJK0708	99.6	66.9
17	MJK0713	100	84.3
18	TJK0079	100	83.2
19	TJK0110	100	70.1
20	TJK0331	99.6	87.1
21	TJK0357	100	91.1
22	TJK0375	100	92.5
23	TJK0404	100	80.9
24	TJK0519	100	84.5
25	TJK0535	100	92.7

**Fig. 4b**

<b>LLC INDOLENTE</b>			<b>N=23</b>
<b>ID</b>	<b>CRC ID</b>	<b>% VH</b>	<b>% ZAP</b>
26	IWF0113	92.9	0.6
27	IWF0145	92.6	0.5
28	JGG0259	92.9	0.1
29	JGG0374	94.7	0.2
30	KRR0032	91.8	7.1
31	KRR0071	94.7	10.9
32	KRR0168	91.8	1
33	MJK0101	97.2	7.6
34	MJK0178	90.2	9.2
35	MJK0283	91	9.4
36	MJK0329	92.2	8.3
37	MJK0368	96.8	7
38	MJK0377	92.2	6.7
39	MJK0379	92.3	6.4
40	MJK0430	89.8	9.3
41	MJK0520	96.5	6.9
42	MJK0649	96.1	9.3
43	MJK0793	95.4	8.5
44	TJK0076	92.7	7.3
45	TJK0203	97.5	9.8
46	TJK0401	93.9	7.3
47	TJK0540	90.4	9.7
49	TJK0585	95.2	9.8

**Fig. 4c**

LLC AGRESIVA con del de 11q				N= 32
ID	CRC ID	% VH	% ZAP	FISH
50	IWF0016	99.6	45.5	delección 11q
51	IWF0097	100	5.9	delección 11
52	JCB0061	99.6	ND	delección 11q
53	JCB0216	100	25.4	delección 11q
54	JCB0217	ND	ND	delección 11q
55	MJK0016	100	59.1	delección 11q
56	MJK0046	99.6	36.2	en 61% de las células
57	MJK0059	100	31.7	en 11% de las células
58	MJK0093	100	20.7	en 83% de las células
59	MJK0095	ND	ND	en 81% de las células
60	MJK0135	100	47.8	en 10% de las células
61	MJK0198	99.3	23.6	delección 11q
62	MJK0208	100	51.2	delección 11q
63	MJK0323	98.9	37.8	delección 11q
64	MJK0459	95.7	26.6	en 90% de las células
65	MJK0479	100	39.1	en 43% de las células
66	MJK0497	98	39.8	en 55% de las células
67	MJK0510	99.3	20.3	en 90% de las células
68	MJK0630	99.6	68.9	en 54% de las células
69	MJK0638	100	38.1	en 64% de las células
70	MJK0673	ND	26.7	en 93% de las células
71	MJK0825	100	34.7	en 14% de las células
72	MJK0919	100	23.3	en 24% de las células
73	TJK0008	ND	23.2	delección 11q
74	TJK0011	100	14.3	delección 11q
75	TJK0220	100	10.3	delección 11q
76	TJK0395	98	3.7	delección 11q
77	TJK0405	100	27.3	en 50% cells
78	TJK0410	99.6	3.4	delección 11q
79	TJK0436	100	16.5	delección 11q
80	TJK0550	ND	0.6	en 96% de las células
81	TJK0577	98.9	22.1	delección 11q

Fig. 4d

Tabla 2. Comparación pareada de la expresión de microARN en tres tipos de LLC-B

MicroARN	Posición cromosómica	Agresiva (crom.11 normal)	Indolente	Valor p	Cambio agresiva crom.11 normal/indolente)
miR-515-1 5p	19q13.41	38	73	0.000052	0.53
miR-301	17q22	36	64	0.002149	0.56
miR-29b-1	7q32.3	1860	3322	0.003335	0.56
miR-452*	Xq28	49	27	0.000209	1.86
miR-378	5q33.1	59	30	0.000002	1.99
miR-515-1 5p	19q13.41	67	38	0.000013	1.77
miR-450-1	Xq26.3	108	59	0.000020	1.83
miR-424	Xq26.3	84	48	0.000052	1.75
miR-181b-1	1q31.3	234	466	0.001839	0.50
miR-21	17q23.1	1514	2928	0.001724	0.52
miR-103-2	20p13	2648	5099	0.001596	0.52
miR-128b	3p22.3	224	416	0.001434	0.54
miR-30d	8q24.22	2783	5420	0.001371	0.51
miR-93	7q22.1	555	950	0.00129	0.58
miR-181a-1	1q31.3	74	172	0.001141	0.43
miR-15b	3q26.1	268	561	0.000968	0.48
miR-106a	Xq26.2	745	1422	0.000924	0.52
miR-103-1	5q35.1	3184	6470	0.000881	0.49
miR-107	10q23.31	2331	4484	0.000764	0.52
miR-21	17q23.1	1824	3761	0.000764	0.49
miR-181d	19p13.12	91	194	0.000695	0.47
miR-138-2	16q13	114	229	0.000602	0.50
miR-130b	22q11.21	146	269	0.000596	0.54
miR-107	10q23.31	2802	5509	0.000328	0.51
miR-10a	17q21.32	34	100	0.000287	0.33
miR-30a	6q13	156	305	0.000255	0.51
miR-19b-1	13q31.3	128	245	0.000149	0.52
miR-367	4q25	135	276	0.00013	0.49
miR-181c	19p13.2	52	106	0.000106	0.49
miR-191	3p21.31	1920	4456	0.000102	0.43
miR-10b	2q31.1	30	88	0.000047	0.35
miR-146a	5q33.3	1458	4760	0.000033	0.31
miR-146b	10q24.32	1351	3865	0.000008	0.35
miR-95	4p16.1	74	148	0.000003	0.50

Fig. 5

MicroARN	Posición cromosómica	Agresiva (crom.11 normal)	Indolente	Valor p	Cambio agresiva crom.11 normal/indolente)
miR-452*	Xq28	23	49	p < 0.000001	0.47
miR-363	Xq26.2	50	158	p < 0.000001	0.32
miR-526b*	19q13.41	26	48	0.000003	0.54
miR-301	17q22	31	64	0.000004	0.49
miR-19b-1	13q31.3	128	267	0.000004	0.48
miR-30a	6q13	156	386	0.000008	0.41
miR-29c	1q32.2	2017	5695	0.000009	0.35
miR-363	Xq26.2	50	93	0.000042	0.54
miR-19b-2	Xq26.2	161	282	0.000112	0.57
miR-29b-2	1q32.2	1440	3305	0.000152	0.44
miR-19a	13q31.3	89	170	0.000163	0.52
miR-29b-2	1q32.2	2727	6267	0.000262	0.44
miR-138-2	16q13	114	228	0.000365	0.50
miR-29b-1	7q32.3	1569	3322	0.000379	0.47
miR-181c	19p13.2	52	111	0.000385	0.46
miR-215	1q41	180	351	0.000627	0.51
miR-106a	Xq26.2	745	1393	0.001389	0.53
miR-29a	7q32.3	2904	6014	0.001643	0.48
miR-30a	6q13	1137	2049	0.002204	0.56
miR-367	4q25	135	258	0.002244	0.52
miR-140	16q22.1	572	1194	0.00244	0.48
miR-107	10q23.31	2331	4287	0.002478	0.54
miR-30d	8q24.22	2783	5140	0.002953	0.54
miR-181a-1	1q31.3	74	176	0.002987	0.42

**Fig. 5 cont.**