

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 799**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2004** **E 04815833 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **27.09.2006** **EP 1704250**

54 Título: **Métodos para predecir y superar la resistencia a quimioterapia en cáncer de ovario**

30 Prioridad:

31.12.2003 US 533505 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2013

73 Titular/es:

**THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
304 OLD MAIN
UNIVERSITY PARK, PA 16802-1504, US**

72 Inventor/es:

AL-MURRANI, SAMER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 394 799 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

Métodos para predecir y superar la resistencia a quimioterapia en cáncer de ovario

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para predecir si un tumor de una paciente de cáncer de ovario será resistente a quimioterapia.

10 La invención también se refiere a métodos para seguir la eficacia de la terapia en una paciente tratada para el cáncer de ovario.

La invención también se refiere a compuestos para reducir la resistencia al tratamiento o terapia con fármacos quimioterapéuticos en células de cáncer de ovario que son resistentes a pautas de tratamiento quimioterapéutico convencionales.

15

Antecedentes de la invención

20 El cáncer de ovario es el más letal de los tumores malignos ginecológicos con un índice de mortalidad del 60%. Los índices de supervivencia de cinco años para los diferentes estadios clínicos de la enfermedad son como sigue: estadio I > 90%, estadio II = 80%, estadio III = 20% y estadio IV = 10%; hay una caída significativa en los índices de supervivencia en los estadios tardíos de la enfermedad. El tratamiento de referencia para estadios avanzados de la enfermedad incluye cirugía citorreductora seguida por quimioterapia.

25 Para la mayoría de las pacientes hay una baja probabilidad de supervivencia, ya que aproximadamente el 75% de todas las pacientes son diagnosticadas en los estadios III y IV de la enfermedad y el mal pronóstico se asocia con el diagnóstico tardío de la enfermedad en sus estadios avanzados. Otro problema principal es la resistencia a los agentes quimioterapéuticos actualmente disponibles. Aunque la respuesta clínica completa se alcanza en el 75% de las pacientes después del tratamiento inicial, la mayoría desarrollarán enfermedad recurrente y requerirán volver a tratarse. Desgraciadamente, la inmensa mayoría finalmente desarrollará quimiorresistencia y sucumbirá a la enfermedad.

30

La quimiorresistencia es un fenómeno complejo que implica un cambio en la expresión y actividad biológica de varios genes y productos génicos. Se pueden usar genes o familias de genes que se expresan diferentemente en individuos sensibles y no sensibles como marcadores moleculares para predecir qué pacientes podrían ser resistentes a un agente quimioterapéutico particular o una combinación de los mismos, como típicamente se usa clínicamente. Además, los genes que se sobreexpresan en individuos quimiorresistentes pueden ser dianas para su inhibición, que puede disminuir la resistencia de una célula cancerosa a un agente o agentes quimioterapéutico(s).

35

40 Como con el cáncer de ovario, la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal es mejor cuando la enfermedad se diagnostica pronto. Si el cáncer se detecta pronto, el índice de supervivencia de cinco años para los pacientes de cáncer de colon es aproximadamente el 90%; desgraciadamente, a pesar de la vigilancia aumentada y las medidas preventivas, solo el 37% de los cánceres se encuentran en este estadio temprano. Cuando el cáncer se ha extendido regionalmente para afectar a otros órganos el índice de supervivencia cae a aproximadamente al 64% y disminuye drásticamente (8%) después de que el cáncer haya metastatizado (Cancer Facts and Figures 2002; publicación de la American Cancer Society).

45

Por tanto, hay una necesidad para identificar cánceres de colon y ovario pronto en el curso del proceso de la enfermedad, y una necesidad particular para identificar cánceres que son quimiorresistentes. Más específicamente, puesto que en la técnica se entiende que el comportamiento de las células cancerosas, tanto respecto a su tumorigenicidad como a su resistencia a fármacos quimioterapéuticos, está mediado por la expresión de un conjunto de genes particulares no completamente definidos, hay una necesidad en la técnica para identificar genes y colecciones o conjuntos de genes que sirvan como marcadores moleculares eficaces para la quimiorresistencia en cáncer de ovario, así como tales genes o conjuntos de genes que proporcionen dianas terapéuticas clínicamente eficaces para el cáncer de ovario y el cáncer de colon.

50

55

La presente solicitud se refiere a métodos y reactivos para identificar genes implicados en, o cuya expresión está modulada por, o en donde dicha expresión modulada se asocia con o es responsable de resistencia a un tratamiento con fármacos quimioterapéuticos. En particular, la divulgación proporciona genes implicados en, o cuya expresión está modulada por, o en donde dicha expresión modulada se asocia con o es responsable de resistencia a un tratamiento con fármacos quimioterapéuticos, así como patrones de expresión génica modulada de una pluralidad de genes en donde dichos patrones son característicos de células resistentes a fármacos quimioterapéuticos, particularmente de células de cáncer de ovario resistentes a fármacos. Además se proporcionan métodos para identificar compuestos que interaccionan con o afectan la expresión o la actividad de uno o una pluralidad de dichos genes. También se proporcionan dichos compuestos que son útiles como alternativas a o junto a agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer de ovario, particularmente tales cánceres que son o se han vuelto

60

65

resistentes al tratamiento quimioterapéutico convencional. También se proporcionan métodos y reactivos para seguir el tratamiento quimioterapéutico para identificar pacientes cuyos tumores son o se han vuelto resistentes a agentes quimioterapéuticos.

- 5 Además se divulgan métodos para identificar compuestos que disminuyen la resistencia a fármacos quimioterapéuticos e inhiben, retrasan o previenen el crecimiento de células tumorales, lo más preferiblemente células de cáncer de ovario, que son resistentes a un agente quimioterapéutico, el método comprende los pasos de:
- 10 (a) poner en contacto con un compuesto de prueba una célula resistente a fármacos quimioterapéuticos que crece en presencia de un agente quimioterapéutico durante un tiempo o a una concentración en donde la célula es resistente al fármaco y en donde la célula expresa al menos un gen que se sobreexpresa en células de cáncer de ovario quimiorresistentes, en donde el gen sobreexpresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082 (identificados por los números de acceso de GenBank mostrados en la tabla 1);
- 15 (b) ensayar la expresión o actividad de uno o una pluralidad de dichos genes o productos génicos en dichas células en presencia y ausencia del compuesto de prueba; y/o (c) comparar el crecimiento celular y/o la expresión o actividad de al menos uno de los genes o productos génicos en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en donde un compuesto se identifica como un compuesto que inhibe el crecimiento de células tumorales quimiorresistentes si la expresión o actividad del gen o producto génico en presencia del compuesto de prueba se reduce relativa a la expresión del gen en ausencia del compuesto de prueba, o si el crecimiento celular se inhibe en presencia del compuesto, o ambos. En ciertas formas de realización, la expresión génica se detecta ensayando una muestra biológica usando una matriz de, entre otros, sondas de ácidos nucleicos (genes) o anticuerpos específicos para una pluralidad de productos génicos identificados en el presente documento.
- 25 También se divulgan métodos para disminuir la resistencia a fármacos, o inhibir, retrasar o prevenir el crecimiento de una célula tumoral, o ambos, que comprende el paso de poner en contacto la célula tumoral con al menos un inhibidor de un gen celular, en donde el gen celular es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082 en presencia de un fármaco quimioterapéutico durante un tiempo o a una concentración
- 30 en donde la célula es resistente al fármaco en ausencia del inhibidor del gen celular. En formas de realización preferidas, la célula tumoral es una célula tumoral humana, y más preferiblemente una célula de cáncer de ovario. En aspectos particulares, uno o una pluralidad de los genes identificados según la invención se inhiben con ARN antisentido o moléculas de ARNip específicamente diseñadas para dirigirse a uno o una pluralidad de dichos genes.
- 35 En aspectos alternativos, los productos génicos de dichos genes se inhiben usando inhibidores de estas proteínas.

También se divulgan métodos para inhibir, retrasar o prevenir el crecimiento de una célula tumoral, lo más preferiblemente una célula de cáncer de ovario, el método comprende el paso de poner en contacto la célula tumoral con una combinación de un agente o agentes quimioterapéutico(s) y al menos un inhibidor de un gen celular, en donde el gen celular es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , WDR1, dedos fusionados, NM23D, grancalcina, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7 o KIAA0082. En un aspecto particular, el gen celular es MetAP2, el agente quimioterapéutico está basado en platino, y el al menos un inhibidor es fumagilina o un derivado de fumagilina. En otro aspecto particular, el gen celular el calpaína 2, el agente quimioterapéutico está basado en platino, y el al menos un inhibidor es N-acetil-leucil-leucil-norleucina (ALLN) o un derivado del mismo. Un inhibidor de un gen celular mostrado en la tabla 1 puede ser, por ejemplo, una molécula de ARNip o una molécula de ARNhc que está específicamente diseñada para dirigirse a un gen mostrado en la tabla 1, o un inhibidor de molécula pequeña.

La invención también proporciona métodos de predecir si el tumor de una paciente con cáncer de ovario será resistente al tratamiento quimioterapéutico, que comprende los pasos de: (a) detectar una cantidad de uno o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra biológica tomada de la paciente, en donde el gen expresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082; (b) detectar una cantidad del o de la pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra control que comprende una muestra de tejido no tumoral, lo más preferiblemente del tejido de origen del tumor, o una muestra de tejido de una paciente que respondía bien a la quimioterapia, correspondiente al uno o la pluralidad de genes expresados o productos génicos detectados en la subparte (a), en donde el gen expresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082; y (c) comparar la cantidad del gen expresado o producto génico medido en el paso (a) con la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (b), en donde se predice que la paciente será resistente a la quimioterapia si la cantidad detectada en el paso (a) es mayor que la cantidad detectada en el paso (b) en un factor de al menos el 20%. En un aspecto particular, la muestra biológica es una muestra tumoral. En un aspecto particular, la muestra control es una muestra biológica obtenida de una paciente de cáncer que es

sensible a la quimioterapia. En ciertas formas de realización, la expresión génica se detecta ensayando una muestra biológica usando una matriz de, entre otros, sondas de ácidos nucleicos (genes) o anticuerpos específicos para una pluralidad de productos génicos identificados en el presente documento.

5 También se divulgan métodos para seguir la evolución de la enfermedad en una paciente de cáncer de ovario, particularmente una paciente de cáncer de ovario que se trata con un tratamiento quimioterapéutico, que comprende los pasos de: (a) detectar una cantidad de uno o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra biológica tomada de la paciente, en donde el gen expresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, 10 dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082; (b) repetir el paso (a) usando una muestra biológica recogida posteriormente obtenida de la paciente; y (c) comparar la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (a) con la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (b), en donde la evolución de la enfermedad se sigue detectando cambios en la cantidad de 15 gen expresado o productos génicos en la muestra biológica recogida posteriormente comparada con la muestra biológica tomada en el paso (a), y en donde la evolución de la enfermedad se detecta cuando la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (b) es mayor que la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (a). En ciertas formas de realización, la paciente se somete a un tratamiento quimioterapéutico u otro durante el periodo entre de detectar la cantidad de expresión génica en el paso (a) y la cantidad detectada en el paso (b). En un aspecto particular, la muestra biológica es una muestra tumoral. En formas de realización preferidas, la expresión génica se detecta ensayando una muestra biológica usando una matriz de, entre otros, sondas de ácidos nucleicos (genes) o anticuerpos específicos para una pluralidad de productos génicos identificados en el presente documento.

25 producto génico detectado en el paso (a) con la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (b), en donde la evolución de la enfermedad se sigue detectando cambios en la cantidad de gen expresado o productos génicos en la muestra biológica recogida posteriormente comparada con la muestra biológica tomada en el paso (a), y en donde la evolución de la enfermedad se detecta cuando la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (b) es menor que o igual a la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (a). En ciertas formas de realización, la paciente se somete a un tratamiento quimioterapéutico u otro 30 durante el periodo entre de detectar la cantidad de expresión génica en el paso (a) y la cantidad detectada en el paso (b). En un aspecto particular, la muestra biológica es una muestra tumoral. En ciertas formas de realización, la expresión génica se detecta ensayando una muestra biológica usando una matriz de, entre otros, sondas de ácidos nucleicos (genes) o anticuerpos específicos para una pluralidad de productos génicos identificados en el presente documento.

También se divulgan métodos para seguir la eficacia de una composición farmacéutica como un agente para el tratamiento de cáncer, particularmente cáncer de ovario o colon en un paciente, que comprende los pasos de: (a) 40 detectar una cantidad de uno o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra biológica tomada de un paciente, en donde el gen expresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082; (b) administrar una cantidad de una composición farmacéutica al paciente; (c) repetir el paso (a) usando una muestra biológica obtenida posteriormente del paciente; y (d) 45 comparar la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (a) con la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (c), en donde la eficacia de la composición farmacéutica se sigue detectando cambios en la cantidad de gen expresado o productos génicos en la muestra biológica recogida posteriormente comparada con la muestra biológica tomada en el paso (a), y en donde la composición farmacéutica es eficaz cuando la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (c) es menor que la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (a) y donde el crecimiento del tumor disminuye (es decir, se frena, retrasa o inhibe) en presencia de la composición farmacéutica. En un aspecto particular, la muestra biológica es una muestra tumoral. En ciertas formas de realización, la expresión génica se detecta ensayando una muestra biológica usando una matriz de, entre otros, sondas de ácidos nucleicos (genes) o anticuerpos específicos para una pluralidad de productos génicos identificados en el presente documento.

55 También se contemplan métodos para diagnosticar cáncer y/o resistencia a un fármaco quimioterapéutico en un animal, preferiblemente un ser humano, dichos métodos comprenden el paso de detectar un patrón de cambios en la cantidad de dos o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos. Los ejemplos de genes expresados son los genes mostrados en la tabla 1. En general, estos métodos comprenden los 60 pasos de: (a) obtener una muestra biológica de un animal, preferiblemente un ser humano; (b) detectar una cantidad de dos o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en la muestra biológica, en donde el gen expresado se muestra en la tabla 1; (c) detectar una cantidad de dos o una pluralidad de genes expresados o productos génicos detectados en una muestra control; (d) determinar un patrón de cambios en la cantidad de dos o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos comparando la cantidad de los dos o la pluralidad de genes expresados o productos génicos del paso (b) con la 65 cantidad en el paso (c), en donde el patrón se asocia con un cáncer, por ejemplo cáncer de colon o de ovario, o

resistencia a fármacos, por ejemplo resistencia a cisplatino. En ciertas formas de realización, la expresión génica se detecta ensayando una muestra biológica usando una matriz de, entre otros, sondas de ácidos nucleicos (genes) o anticuerpos específicos para una pluralidad de productos génicos identificados en el presente documento.

5 También se divulgan métodos para detectar resistencia a fármacos quimioterapéuticos en un animal con cáncer de ovario, el método comprende los pasos de: (a) detectar una cantidad de una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra biológica tomada del animal, en donde el gen expresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082; (b) detectar una
10 cantidad de dicha pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra control que comprende tejido ovárico no tumoral o tejido tumoral de una paciente sensible a la quimioterapia, correspondiente a la pluralidad de genes expresados o productos génicos detectados en la subparte (a), en donde el gen expresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082; y (c)
15 comparar la cantidad de gen expresado o producto génico medido en el paso (a) con la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (b), en donde se predice que la paciente será resistente a la quimioterapia si la cantidad detectada en el paso (a) es mayor que la cantidad detectada en el paso (b) en un factor de al menos el 20%. Como se proporciona en el presente documento, la pluralidad de dichos genes en donde la cantidad detectada en el paso (a) es mayor que la cantidad detectada en el paso (b) en un factor de al menos el 20% define un patrón de expresión génica específico para muestras tumorales que son resistentes a un fármaco quimioterapéutico. En un aspecto particular, la muestra control es una muestra biológica obtenida de una paciente de cáncer que es sensible a la quimioterapia. Preferiblemente, la expresión de uno o una pluralidad de dichos genes es mayor en la muestra
25 tumoral detectada en el paso (a) que en la muestra control detectada en el paso (b). En formas de realización preferidas, el animal es un ser humano, lo más preferiblemente una paciente de cáncer humana. Como se divulga en el presente documento, la invención proporciona además un patrón de expresión génica que predice la resistencia a dicho fármaco quimioterapéutico cuando dicho patrón de expresión génica se detecta. En formas de realización preferidas, la expresión génica se detecta ensayando una muestra biológica usando una matriz de, entre otros, sondas de ácidos nucleicos (genes) o anticuerpos específicos para una pluralidad de productos génicos identificados en el presente documento.

Ventajosamente, algunos genes identificados en el presente documento nunca han sido reconocidos como asociados con cáncer de ovario o de colon y pueden demostrar ser nuevas dianas para la intervención con estas
35 enfermedades.

Formas de realización preferidas específicas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas formas de realización preferidas y las reivindicaciones.

40 Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que S100A10 se expresa a niveles aumentados en líneas celulares de cáncer de ovario que tienen resistencia aumentada a
45 fármaco(s) quimioterapéutico(s).

La figura 2 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que S100A11 se expresa a niveles aumentados en líneas celulares de cáncer de ovario que tienen resistencia aumentada a
50 fármaco(s) quimioterapéutico(s).

La figura 3 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que los niveles de ARNm para S100A10 y S100A11 están aumentados en una muestra tumoral de un paciente que es más
55 resistente a quimioterapia comparada con una muestra de un paciente que es más sensible.

La figura 4 es un gráfico que representa los resultados de PCR en tiempo real cuantitativa que demuestran que SPARC se expresaba a niveles aumentados en líneas celulares quimiorresistentes.

La figura 5 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern que demuestran que el ARNm de SPARC estaba elevado en muestras tomadas de un paciente cuyo
60 cáncer había reaparecido.

La figura 6 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que los niveles de ARNm de calpaína 2 estaban aumentados en las líneas celulares de cáncer de ovario quimiorresistentes.
65

La figura 7 es una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que los niveles de ARNm de grancalcina estaban elevados en líneas celulares quimiorresistentes comparadas con líneas celulares sensibles al tratamiento con cisplatino.

La figura 8 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por inmunotransferencia y una representación gráfica de los resultados de la inmunotransferencia que demuestran que la expresión de la proteína MetAP2 estaba elevada en la línea celular altamente quimiorresistente OVCA 429 y disminuida en la línea celular Hey, que es sensible al tratamiento con cisplatino.

La figura 9 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que muestran los niveles de ARNm de MetAP2 en muestras de tejido obtenidas de tres pacientes con diferentes niveles de resistencia a quimioterapia basada en cisplatino. MetAP2 está más elevada en la muestra del paciente que tiene el tumor más resistente (CAP3) comparado con los pacientes con niveles intermedios (CAP2) y bajos (CAP1) de resistencia a quimioterapia.

La figura 10 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que se detectan dos transcritos de eIF5 y que los niveles de expresión de ambos estaban elevados en líneas celulares de cáncer de ovario con el mayor nivel de resistencia a cisplatino.

La figura 11 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que presentan la expresión de eIF5 en una muestra tumoral de un paciente quimiorresistente antes (CAP2) y después de la recidiva del tumor (CAP2+).

La figura 12 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm para eIF2Bε estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes.

La figura 13 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm para eEF1ε estaba disminuido en líneas celulares de cáncer de ovario que eran las más resistentes a cisplatino.

La figura 14 muestra una representación gráfica de los resultados de transferencia Northern que demuestran que los niveles de ARNm de SAPK/Erk1 estaban elevados en líneas celulares resistentes a cisplatino comparadas con líneas celulares sensibles.

La figura 15 muestra una representación gráfica de los resultados de transferencia Northern que demuestran que el ARNm de TESK2 estaba elevado en líneas celulares resistentes a cisplatino.

La figura 16 muestra una representación gráfica de los resultados de transferencia Northern que demuestran que el ARNm de la quinasa FAST estaba elevado en líneas celulares resistentes a cisplatino.

La figura 17 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que los niveles de expresión de KLK6 estaban elevados en las líneas celulares resistentes a cisplatino probadas.

La figura 18 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que la expresión de HMT1 disminuía en células que eran resistentes a cisplatino.

La figura 19 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de ARA9 estaba elevado en líneas celulares resistentes a cisplatino.

La figura 20 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que la expresión de calponina 2 estaba elevada en líneas celulares quimiorresistentes comparada con líneas celulares de cáncer de ovario quimiosensibles.

La figura 21 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que la expresión de génica de la proteína inhibidora de apoptosis neuronal disminuía en las líneas celulares más resistentes a cisplatino.

- La figura 22 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que los niveles de RNPS1 estaban elevados en líneas celulares resistentes a cisplatino.
- La figura 23 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que los niveles del ARNm para HSF2 estaban elevados en líneas celulares quimiorresistentes.
- La figura 24 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm para WDR1 estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes comparada con líneas celulares quimiosensibles.
- La figura 25 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que los niveles del ARNm de Ft1 estaban elevados en líneas celulares resistentes a cisplatino.
- La figura 26 es una fotografía de una autorradiografía que muestra los resultados del análisis por transferencia Northern y una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que los niveles del ARNm de NME4 estaban elevados en líneas celulares quimiorresistentes.
- La figura 27 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de ADAR1 estaba elevado en líneas celulares que son resistentes a cisplatino.
- La figura 28 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de NBR1 estaba elevado en OVCA 429, la línea celular más quimiorresistente, comparada con otras líneas celulares probadas.
- La figura 29 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestra que el ARNm para la proteína con dedo de zinc 262 estaba elevado en la línea celular más resistente a cisplatino, comparada con otras líneas celulares probadas.
- La figura 30 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de MRPL4 estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes.
- La figura 31 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de HYA22 estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes comparadas con las quimiosensibles.
- La figura 32 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm para vinexina β estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes.
- La figura 33 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm para G-CSFR estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes.
- La figura 34 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de SRB1 estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes.
- La figura 35 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de IGFBP-7 estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes.
- La figura 36 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de RAB22A estaba disminuido en líneas celulares quimiorresistentes y se eleva en las líneas celulares más sensibles.
- La figura 37 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que la expresión del ARNm de KIAA0082 estaba elevada en líneas celulares quimiorresistentes.
- La figura 38 muestra una representación gráfica de los resultados de la transferencia Northern que demuestran que el ARNm de NCOR2 estaba reducido en líneas celulares resistentes a cisplatino comparadas con las sensibles.
- La figura 39 muestra el orden de cinco líneas celulares de cáncer de ovario según su nivel de sensibilidad a cisplatino basándose en los resultados de ensayos de MTT.
- La figura 40 (panel superior) representa un gráfico que muestra los efectos de aumentar la concentración de fumagilina en la supervivencia de células OVCA 429 después de 4 horas de exposición al fármaco. El panel inferior

representa un gráfico que muestra que hubo un aumento del efecto de cisplatino en presencia de fumagilina 0,1 µg/ml pero no cuando las células se trataron con cisplatino en presencia de fumagilina 10 µg/ml durante 4 horas.

La figura 41 (panel superior) representa un gráfico que muestra los efectos de aumentar la concentración de fumagilina en la supervivencia de células OVCA 429 después de 8 horas de exposición al fármaco.

La figura 41 (panel inferior) representa un gráfico que muestra que hubo un aumento del efecto de cisplatino en presencia de fumagilina 0,1 µg/ml pero no cuando las células se trataron con cisplatino en presencia de fumagilina 10µg/ml durante 8 horas.

La figura 42 (panel superior) representa un gráfico que muestra los efectos de aumentar la concentración de fumagilina en la supervivencia de células OVCA 429 después de 24 horas de exposición al fármaco.

La figura 42 (panel inferior) representa un gráfico que muestra que hubo un aumento del efecto citotóxico de cisplatino en presencia de fumagilina 0,1 µg/ml pero no cuando las células se trataron con cisplatino en presencia de fumagilina 10µg/ml durante 24 horas.

La figura 43 es una representación esquemática de tres ARNip (#1, SEQ ID NO: 4; #2, SEQ ID NO: 5; y #3, SEQ ID NO: 6) diseñados contra diferentes regiones del ARN mensajero de MetAP-2.

La figura 44 muestra el efecto del ARNip #1 en los niveles de expresión de MetAP-2 en OVCA 429 determinados mediante PCR en tiempo real cuantitativa.

La figura 45 es un gráfico que representa la cuantificación de la supervivencia celular determinada mediante ensayos de MTT después de exponer OVCA 429 a cisplatino en presencia del ARNip #1.

La figura 46 es una fotografía de placas de 96 pocillos que contienen células OVCA 429 después de realizar el ensayo de MTT (la cuantificación se muestra en la figura 45) que muestra los efectos del cisplatino en estas células transfectadas con el ARNip #1 de MetAP-2.

La figura 47 es una representación esquemática de tres ARNip (#1, SEQ ID NO: 1; #2, SEQ ID NO: 2; y #3, SEQ ID NO: 3) diseñados contra diferentes regiones del mensaje de SPARC.

La figura 48 es un gráfico que representa los resultados del análisis por PCR en tiempo real cuantitativa de la expresión de SPARC en células OVCA 429 transfectadas con los ARNip mostrados en la figura 47.

La figura 49 es una fotografía de placas de 96 pocillos que contienen células OVCA 429 después de realizar el ensayo de MTT para determinar los efectos del cisplatino en células OVCA 429 en presencia del ARNip #2 de SPARC.

La figura 50 es un gráfico que representa los efectos de la reducción mediada por ARNip de la expresión del gen SPARC sobre la sensibilidad a cisplatino en células OVCA 429.

La figura 51 muestra una representación gráfica de los resultados de transferencia Northern que demuestran que el ARNm de MT1 estaba altamente elevado en la línea celular más sensible a cisplatino (Hey).

La figura 52 muestra una representación gráfica de los resultados de transferencia Northern que demuestran que el ARNm de MPP10 aumentaba al aumentar la sensibilidad a cisplatino.

La figura 53 es un gráfico que representa los efectos de la reducción mediada por ARNip de la expresión génica de calpaína 2 en células OVCA 429.

La figura 54 es un gráfico que representa los efectos del ARNip #3 de calpaína 2 sobre la sensibilidad a cisplatino en células OVCA 429.

La figura 55 es un gráfico que representa los efectos del inhibidor de calpaína 2 ALLN sobre la sensibilidad a cisplatino en células OVCA 429.

La figura 56 es un gráfico que representa los efectos de la reducción mediada por ARNip de la expresión del gen SA100A10 sobre la sensibilidad a cisplatino en células OVCA 429.

La figura 57 es un gráfico que representa los efectos de los ARNip sobre los niveles de expresión del ARNm del gen S100A11 en células OVCA 429.

La figura 58 es un gráfico que representa los niveles de expresión del ARNm de MetAP-2 en el ADNc de células normales y de cáncer de colon.

La figura 59 es un gráfico que representa los niveles de expresión del ARNm de SPARC en el ADNc de células normales y de cáncer de colon.

- 5 La figura 60 es un gráfico que representa los niveles de expresión del ARNm de S100A11 en el ADNc de células normales y de cáncer de colon.

La figura 61 es un gráfico que representa los niveles de expresión del ARNm de S100A10 en el ADNc de células normales y de cáncer de colon.

- 10 La figura 62 es un gráfico que representa los niveles de expresión del ARNm de calpaína 2 en el ADNc de células normales y de cáncer de colon.

- 15 La figura 63 muestra el volumen del tumor como función del peso corporal de dos ratones desnudos inyectados con células OVCAR-3 (15 millones/inyección, obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, No. de acceso HTB-161) y tratados después de 35 días con cisplatino a 4 µg/kg de peso corporal administrado por inyección IP 3 veces por semana durante 2 semanas, seguido por 1 semana sin tratamiento o tratados con solución salina sola como control.

- 20 La figura 64 es un gráfico que muestra la expresión estable de los ARNip contra calpaína 2 o S100A11 en células OVCAR-3. En los carriles control, se midió la expresión de ambos ARNm en células sin tratamiento o el ARNip irrelevante de GFP. La expresión del ARNm de calpaína 2 y S100A11 se redujo mucho en los carriles de los ARNip relevantes.

25 Descripción detallada de las formas de realización preferidas

- La invención proporciona composiciones para su uso en métodos de inhibición del crecimiento de una célula tumoral de cáncer de ovario. Dichos métodos pueden comprender el paso de poner en contacto la célula tumoral en presencia de un fármaco quimioterapéutico a una concentración a la que la célula es resistente con al menos un inhibidor ARNip o ARNhc del gen celular S100A10, en donde poner en contacto la célula tumoral con dicho inhibidor reduce, inhibe, retrasa o previene la resistencia al fármaco en la célula tumoral. En el método la célula tumoral se pone en contacto *in vivo* (por ejemplo, es una célula que no se ha retirado de un paciente).

- 35 El término "muestra biológica" como se usa en el presente documento incluye, pero no está limitado a, un tejido o líquido corporal obtenido de un animal, preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser material de biopsia, muestras de médula ósea, sangre, plasma sanguíneo, suero o la fracción celular de la misma, orina, saliva, lágrimas o células derivadas de una fuente biológica. En una forma de realización, el mamífero es un ser humano que se sospecha que tiene o se ha diagnosticado previamente como que tiene o en necesidad de cribado para un cáncer, en particular cáncer de ovario o colon. En ciertas formas de realización, una muestra biológica es una muestra tumoral.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término "cáncer de ovario" se entenderá para referirse en general a cáncer epitelial de ovario, que comprende aproximadamente el 80% de todos los cánceres humanos diagnosticados de tejidos ováricos. El resto, que comprende cáncer de ovario derivado de línea germinal y cáncer de ovario de células claras, son raros, y con frecuencia diagnosticados erróneamente. En tanto que los cambios en expresión génica divulgados en el presente documento también se encuentran en estos tipos minoritarios de tumores, los métodos y composiciones de la invención aplican a los mismos.

- 45 Como se usa en el presente documento, un "modulador" de la expresión génica o actividad del producto génico puede ser cualquier compuesto químico, molécula de ácido nucleico, péptido o polipéptido que puede producir un aumento o disminución en la expresión de un gen o la actividad de un producto génico. En ciertas formas de realización, un modulador de la invención es un compuesto que produce un aumento en la expresión o actividad de uno o una pluralidad de genes celulares cuya expresión o actividad disminuye en células tumorales que son resistentes a agentes quimioterapéuticos; tales moduladores se denominan "activadores" en el presente documento.
- 50 En otras formas de realización, un modulador es un inhibidor de la expresión o la actividad de uno o una pluralidad de genes celulares, particularmente un gen cuya expresión aumenta en células tumorales que son resistentes a agentes quimioterapéuticos; tales moduladores se denominan "inhibidores" en el presente documento.

- 55 Como se usa en el presente documento, un "inhibidor" puede ser cualquier compuesto químico, molécula de ácido nucleico, péptido o polipéptido tal como un anticuerpo contra un producto génico que puede reducir la actividad de un producto génico o directamente interferir con la expresión de un gen. Un inhibidor de la invención, por ejemplo, puede inhibir la actividad de una proteína que está codificada por un gen directa o indirectamente. La inhibición directa se puede lograr, por ejemplo, mediante la unión a una proteína y previniendo así que la proteína se una a una diana deseada, tal como un receptor. La inhibición indirecta se puede lograr, por ejemplo, mediante unión a la diana deseada de una proteína, tal como un receptor o un compañero de unión, bloqueando o reduciendo así la actividad de la proteína. Además, un inhibidor de la invención puede inhibir un gen reduciendo o inhibiendo la

expresión del gen, entre otros, mediante interferencia con la expresión génica (transcripción, procesamiento, traducción, modificación postraducciona), por ejemplo, por interferencia con el ARNm del gen y bloqueo de la traducción del producto génico o mediante modificación postraducciona de un producto génico, o produciendo cambios en la localización intracelular.

Como se usa en el presente documento, un “activador” puede ser cualquier compuesto químico, molécula de ácido nucleico, péptido o polipéptido que puede aumentar la actividad de un producto génico (por ejemplo, estabilizando el producto génico, previniendo su degradación proteolítica o aumentando su actividad enzimática o de unión o activando directamente la expresión de un gen). Un activador de la invención puede aumentar la actividad de una proteína que está codificada por un gen directa o indirectamente. La activación directa se puede lograr, por ejemplo, mediante unión a una proteína de aumentando de esta manera la unión de la proteína a una diana deseada, tal como un receptor. La activación indirecta se puede lograr, por ejemplo, mediante unión a la diana deseada de una proteína, tal como un receptor o un compañero de unión, y aumentando la actividad, por ejemplo, aumentando la concentración eficaz de la diana. Además, un activador de la invención puede activar un gen aumentando la expresión del gen, por ejemplo, aumentando la expresión génica (transcripción, procesamiento, traducción, modificación postraducciona), por ejemplo, estabilizando el ARNm del gen o bloqueando la degradación del transcrito de ARNm, o mediante modificación postraducciona de un producto génico, o produciendo cambios en la localización intracelular.

Como se describe en el presente documento, la expresión de varios genes en células de tumor ovárico quimiorresistentes se diferencia sustancialmente de la expresión de los mismos en células de tumor ovárico quimiosensibles. La tabla 1 proporciona una lista de tales genes identificados usando métodos descritos en los ejemplos posteriormente. La tabla también resume los patrones de expresión de estos genes en células sensibles o resistentes a cisplatino, un agente quimioterapéutico ampliamente usado.

Tabla 1

No. de acceso de Genbank	Nombres	Localización cromosómica	Información de la proteína	Patrón de expresión validado en líneas celulares
BC015973	S100A10 p11 CLP11 cadena ligera de calpactina 1 42 C	1q21.3	Extracelular 96 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC001410	S100A11 S100C Calgizarina	1q21.3	Extracelular 105 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
AF261089	Calpaína 2 CANPL2 MCANP	1q41-1q42.11	Citoplásmica y membrana celular 700 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC004974	SPARC Osteonectina BM-40	5q31.3-q33.1	Extracelular 303 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC013782	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	12q22	Citoplásmica 478 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC015525	KLK6 Zima Neurosina Proteasa M	19q13.33	Extracelular 244 aminoácidos	Aumenta con la resistencia aumentada a cisplatino
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	19q13.33	Nuclear 361 aminoácidos	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino
U31913	ARA9 XAP2	11q13.3	Citoplásmica 330 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
D83735	Calponina 2	19q13.3	Citoplásmica 309 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
U19251	NAIP	5q13.1-13.2	Citoplásmica 1403 aminoácidos	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino
BC005291	eEF1ε p18	6p24.3-p25.1	Citoplásmica 174 aminoácidos	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino
AF015608	RNPS1	16p13.3	Citoplásmica	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino

No. de acceso de Genbank	Nombres	Localización cromosómica	Información de la proteína	Patrón de expresión validado en líneas celulares
U49436	eIF5 eIF5A	14q32.32	Citoplásmica 431 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC013590	eIF2Bε	3q27.1	Citoplásmica 721 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
M65217	HSF2 HSTF2	6q22.31	Citoplásmica y nuclear 536 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
AB010427	WDR1 NORI-1	4p16.1	Citoplásmica 606 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC001134	Dedos fusionados (Ft1)	16q12.2	Desconocida 292 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC004880	NM23D mn23-H4	16p13.3	Espacio intermembrana mitocondrial 187 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
U10439	ADAR1	1q21.1-q21.2	Nuclear 1226 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC005214	Grancalcina	2q24.2	Citoplásmica/ Membranas 217 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC009808	NBR1	17q21.1-q21.31	966 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	17p11.2-p12	Citoplásmica 399 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
AB007885	Proteína con dedo de zinc-262 MYM	1p32-p34.3	Desconocida	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
D88153	HYA22	3p21.3	Desconocida	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
AB049635	MRPL4 CGI-28	19p13.2	Mitocondrial	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
AF037261	Vinexina β	8p21.3	Asociada con el citoesqueleto	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
M59818	G-CSFR	1p35-34.3	Membrana celular o forma soluble 836 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC015710	RAB22A	20q13.32	Asociada a membrana 194 aminoácidos	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino
BC017201	IGFBP-7 MAC25 FATL2	4q12	Secretada 282 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC011770	Quinasa FAST	7q36.1	Citoplásmica 549 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
AB057597	TESK2	1p34.1	Nuclear/ asociada con el citoesqueleto	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	12q24.31	Membrana celular	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
BC031890	KIAA0082	6p21.1	Desconocida 836 aminoácidos	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino
NM_006312	NCOR2	12q24	Nuclear 2517 aminoácidos	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino
BC032338	MT1	16q13	Principalmente nuclear, puede ser secretada	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino
X98494	MPP10	2p12-2p13.2	Principalmente citoplásmica,	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino

No. de acceso de Genbank	Nombres	Localización cromosómica	Información de la proteína	Patrón de expresión validado en líneas celulares
			puede ser secretada	

Se ha descrito que las localizaciones cromosómicas que aparecen en **negrita** en la tabla 1 están asociadas con cáncer de ovario (Pejoic, 1995, *Ann. Med.* 27:73-78).

5 Los inhibidores de un gen celular mostrado en la tabla 1 pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo, un ácido nucleico tal como ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) o una molécula de ARN horquillado corto (ARNhc). Además, tales inhibidores se pueden diseñar específicamente usando los métodos descritos en el presente documento o usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos, particularmente anticuerpos neutralizantes y preferiblemente anticuerpos monoclonales, hacia proteínas codificadas por un gen mostrado en la tabla 1 se pueden generar por medios convencionales como se describe, por ejemplo, en "Antibodies: A Laboratory Manual" por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, 1988).

15 En una forma de realización particular, un inhibidor de la invención es un ARNip que se une al ARNm que codifica un gen diana, en donde el gen diana es S100A10.

20 En una forma de realización preferida, ciertos inhibidores proporcionados por la invención son especies de ARN interferente pequeño (ARNip). El término "ARN interferente pequeño" o "ARNip" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico bicatenario capaz de interferencia por ARN o "iARN", como se divulga, por ejemplo, en Bass, 2001, *Nature* 411: 428-429; Elbashir *et al.*, 2001, *Nature* 411: 494-498; y Kreutzer *et al.*, Publicación Internacional PCT No. WO 00/44895; Zernicka-Goetz *et al.*, Publicación Internacional PCT No. WO 01/36646; Fire, Publicación Internacional PCT No. WO 99/32619; Plaetinck *et al.*, Publicación Internacional PCT No. WO 00/01846; Mello y Fire, Publicación Internacional PCT No. WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, Publicación Internacional PCT No. WO 99/07409; y Li *et al.*, Publicación Internacional PCT No. WO 00/44914. Como se usa en el presente documento, las moléculas de ARNip no necesitan estar limitadas a esas moléculas que contienen solo ARN, sino que además abarca nucleótidos químicamente modificados y no nucleótidos que tienen capacidad o actividad de iARN.

30 La iARN mediada por ARN interferente pequeño se ha estudiado en una variedad de sistemas. Fire y col. fueron los primeros en observar iARN en *C. elegans* (1998, *Nature* 391:806). Wianny y Goetz describieron iARN mediada por ARNbc en embriones de ratón (1999, *Nature Cell Biol.* 2:70). Hammond *et al.*, describieron iARN en células de *Drosophila* transfectadas con ARNbc (2000, *Nature* 404:293). Elbashir *et al.*, describieron iARN inducida mediante la introducción de dúplex de ARN sintéticos de 21 nucleótidos en células de mamífero cultivadas incluyendo células de riñón embrionario humano y HeLa (2001, *Nature* 411:494). Estos estudios han mostrado que los dúplex de ARNip que comprenden 21 nucleótidos son más activos cuando contienen 2 nucleótidos sobresalientes en 3'. Además, la sustitución de una o ambas hebras del ARNip con 2'-desoxi o 2'-O-metil nucleótidos suprimió la actividad iARN, mientras que se mostró que se toleraba la sustitución de nucleótidos 3' terminales de ARNip con desoxinucleótidos. También se mostró que las secuencias mal emparejadas en el centro del dúplex del ARNip suprimían la actividad iARN. Además, estos estudios también indican que la posición del sitio de corte en el ARN diana se define por el extremo 5' de la secuencia guía del ARNip más que el extremo 3' (Elbashir *et al.*, 2001, *EMBO J.* 20:6877). Otros estudios han indicado que se requiere un fosfato 5' en la hebra complementaria de la diana de un dúplex de ARNip para la actividad del ARNip y que se utiliza ATP en las células para mantener del grupo fosfato 5' en el ARNip (Nykanen *et al.*, 2001, *Cell* 107:309). Sin embargo, las moléculas de ARNip que carecen de un fosfato en 5' son activas cuando se introducen exógenamente, lo que sugiere que la fosforilación en 5' de las construcciones de ARNip se puede producir *in vivo*. Los ARNip químicamente modificados se pueden inyectar directamente en el torrente sanguíneo para ciertas aplicaciones.

50 Se contemplan vectores de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una molécula de ARNip de la invención, de una manera que permite la expresión de la molécula de ARNip. Por ejemplo, el vector pueden contener secuencia(s) que codifica(n) ambas hebras de una molécula de ARNip que comprende un dúplex. El vector también puede contener secuencia(s) que codifica(n) una única molécula de ácido nucleico que es autocomplementaria y por tanto forma una molécula de ARNip. Se describen ejemplos no limitantes de tales vectores de expresión en Paul *et al.*, 2002, *Nature Biotechnology* 19:505; Miyagishi y Taira, 2002, *Nature Biotechnology* 19:497; Lee *et al.*, 2002, *Nature Biotechnology* 19:500; y Novina *et al.*, 2002, *Nature Medicine*, publicación en línea 3 de junio, 2003.

60 En ciertas formas de realización, las moléculas de ARNip según la invención pueden comprender un vehículo de administración, incluyendo, entre otros liposomas, para la administración a un sujeto, soportes y diluyentes y sus sales, y pueden estar presentes en composiciones farmacéuticas. Se describen métodos para la administración de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, en Akhtar *et al.*, 1992, *Trends Cell Bio.* 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer *et al.*, 1999, *Mol. Membr. Biol.* 16:129-140; Hofland y Huang, 1999, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137:165-192; y Lee *et al.*, 2000, *ACS Symp. Ser.* 752:184-192,

todos ellos se incorporan al presente documento mediante referencia. Beigelman *et al.*, Patente en EE UU No. 6.395.713 y Sullivan *et al.*, documento PCT WO 94/02595, describen además métodos generales para la administración de moléculas de ácido nucleico. Estos protocolos se pueden utilizar para la administración de virtualmente cualquier molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar a células mediante una variedad de métodos que conocen los expertos en la materia, incluyendo, pero no restringidos a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante incorporación en otros vehículos de administración, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos (véase, por ejemplo, O'Hare y Normand, Publicación Internacional PCT No. WO 00/53722).

De forma alternativa, la combinación ácido nucleico/vehículo se puede administrar localmente mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. La inyección directa de las moléculas de ácido nucleico de la invención, sea subcutánea, intramuscular o intradérmica, puede tener lugar usando metodologías estándar de aguja y jeringa, o por tecnologías sin aguja tales como las descritas en Conry *et al.*, 1999, *Clin. Cancer Res.* 5:2330-2337 y Barry *et al.*, Publicación Internacional PCT No. WO 99/31262. Muchos ejemplos en la técnica describen métodos de administración de oligonucleótidos mediante bomba osmótica (véase, Chun *et al.*, 1998, *Neuroscience Letters* 257:135-138, D'Aldin *et al.*, 1998, *Mol. Brain Research* 55:151-164, Dryden *et al.*, 1998, *J. Endocrinol.* 157:169-175, Ghirnkar *et al.*, 1998, *Neuroscience Letters* 247:21-24) o infusión directa (Broaddus *et al.*, 1997, *Neurosurg. Focus* 3, artículo 4). Otras vías de administración incluyen, pero no están limitadas a la administración oral (tal como en forma de comprimido o píldora) y/o administración intratecal (Gold, 1997, *Neuroscience* 76:1153-1158). Se proporcionan descripciones más detalladas de administración de ácidos nucleicos en Sullivan *et al.*, documento PCT WO 94/02595, Draper *et al.*, documento PCT WO93/23569, Beigelman *et al.*, documento PCT WO99/05094, y Klimuk *et al.*, documento PCT WO99/04819.

De forma alternativa, ciertas moléculas de ARNip de la invención se pueden expresar en células a partir de promotores eucariotas (véase, por ejemplo, Izant y Weintraub, 1985, *Science* 229:345; McGarry y Lindquist, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 83:399; Scanlon *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10591-5; Kashani-Sabet *et al.*, 1992, *Antisense Res. Dev.* 2:3-15; Dropulic *et al.*, 1992, *J. Virol.* 66:1432-41; Weerasinghe *et al.*, 1991, *J. Virol.* 65:5531-4; Ojwang *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10802-6; Chen *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:4581-9; Sarver *et al.*, 1990, *Science* 247:1222-1225; Thompson *et al.*, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:2259; Good *et al.*, 1997, *Gene Therapy* 4: 45; Miyagishi *et al.*, 2001, *Nucleic Acids Research* 29:2502; y Kunkel y Pederson, 1989 *Nucleic Acids Research* 17:7371). Los expertos en la materia reconocerán que cualquier ácido nucleico se puede expresar en células eucariotas usando el vector de ADN/ARN apropiado. La actividad de tales ácidos nucleicos puede aumentar por su liberación del transcrito primario por un ácido nucleico enzimático (Draper *et al.*, documento PCT WO 93/23569, y Sullivan *et al.*, documento PCT WO 94/02595; Ohkawa *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 27:15-6; Taira *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19:5125-30; Ventura *et al.*, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21:3249-55; Chowrira *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269:25856).

En otro aspecto de la invención, se pueden expresar moléculas de ARN de la presente invención a partir de unidades de transcripción (véase, por ejemplo, Couture *et al.*, 1996, *TIG* 12:510) insertadas en vectores de ADN o ARN. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de ADN o vectores virales. Se pueden construir vectores virales que expresan ARNip basados en, por ejemplo, pero no limitados a, virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus, lentivirus o alfavirus. En otra forma de realización, se usan construcciones basadas en pol III para expresar moléculas de ácido nucleico de la invención (véase, por ejemplo, Thompson, patentes en EE UU Nos. 5.902.880 y 6.146.886). Los vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ARNip se pueden administrar como se ha descrito anteriormente, y persistir en células diana. De forma alternativa, se pueden usar vectores virales para proporcionar para la expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Tales vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresada, la molécula de ARNip interacciona con el ARNm diana y genera una respuesta de iARN. La administración de vectores que expresan moléculas de ARNip puede ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a células diana explantadas de un sujeto seguido por su reintroducción en el sujeto, o por cualquier otro medio que permitiría la introducción en la célula diana deseada (para una revisión, véase Couture *et al.*, 1996, *TIG* 12:510).

También se divulga un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una molécula de ARNip divulgada en el presente documento. El vector de expresión puede codificar una o ambas hebras de un dúplex de ARNip, o una única hebra autocomplementaria que autohíbrida a un dúplex de ARNip. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas de ARNip pueden estar operativamente unidas de una manera que permite la expresión de la molécula de ARNip (véase, por ejemplo, Paul *et al.*, 2002, *Nature Biotechnology* 19:505; Miyagishi y Taira, 2002, *Nature Biotechnology* 12:497; Lee *et al.*, 2002, *Nature Biotechnology* 19:500; y Novina *et al.*, 2002, *Nature Medicine*, publicación en línea 3 de junio). El término "operativamente unido" se usa en el presente documento para referirse a una disposición de secuencias flanqueantes en donde las secuencias flanqueantes así descritas se configuran o ensamblan de modo que realicen su función habitual. Por tanto, una secuencia flanqueante operativamente unida a una secuencia codificante puede ser capaz de efectuar replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia codificante. Por ejemplo, una secuencia codificante está operativamente unida a un promotor cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de esa secuencia codificante. Una secuencia flanqueante no necesita estar contigua con la secuencia codificante, siempre que funcione correctamente. Por tanto, por ejemplo, pueden estar presente secuencias intermedias no traducidas aunque transcritas entre una

secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora aún se puede considerar "operativamente unida" a la secuencia codificante.

También se divulga un vector de expresión que comprende: a) una región de iniciación de la transcripción (por ejemplo, región de iniciación de pol I, II o II eucariota); b) una región de terminación de la transcripción (por ejemplo, región de terminación de pol I, II o II eucariota); y c) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de las moléculas de ARNip divulgadas en el presente documento; en donde dicha secuencia está operativamente unida a dicha región de iniciación y a dicha región de terminación, de una manera que permite la expresión y/o administración de la molécula de ARNip. El vector puede incluir opcionalmente un marco abierto de lectura (ORF) para una proteína operativamente unida en el lado 5' o el lado 3' de la secuencia que codifica el ARNip divulgado en el presente documento; y/o un intrón (secuencias intermedias).

La transcripción de las secuencias de la molécula de ARNip puede estar dirigida por un promotor de la ARN polimerasa I (pol I), ARN polimerasa II (pol II) o ARN polimerasa III (pol III) eucariotas. Los transcritos de los promotores de pol II o pol III se expresan a niveles altos en todas las células; los niveles de un promotor de pol II determinado en un tipo de célula determinado dependen de la naturaleza de las secuencias génicas reguladoras (potenciadores, silenciadores, etc.) presentes en las cercanías. También se usan promotores de ARN polimerasa procariota, siempre que la enzima ARN polimerasa procariota se exprese en las células apropiadas (Elroy-Stein y Moss, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6743-7; Gao y Huang 1993, *Nucleic Acids Res.* **21**:2867-72; Lieber *et al.*, 1993, *Methods Enzymol.* **217**:47-66; Zhou *et al.*, 1990, *Mol. Cell. Biol.* **10**:4529-37). Varios investigadores han demostrado que las moléculas de ácido nucleico expresadas de tales promotores pueden funcionar en células de mamífero (por ejemplo, Kashani-Sabet *et al.*, 1992, *Antisense Res. Dev.* **2**:3-15; Ojwang *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10802-6; Chen *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Res.* **20**:4581-9; Yu *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6340-4; L'Huillier *et al.*, 1992, *EMBO J.* **11**:4411-8; Lisiewicz *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**:8000-4; Thompson *et al.*, 1995, *Nucleic Acids Res.* **23**:2259; Sullenger y Cech, 1993, *Science* **262**:1566). Más específicamente, las unidades de transcripción tales como las derivadas de los genes que codifican ARN nuclear pequeño U6 (ARNnp), ARN de transferencia (ARNt) y ARN VA de adenovirus son útiles en la generación de altas concentraciones de las moléculas de ARN deseadas tales como ARNip en células (Thompson *et al.*, 1995, *Nucleic Acids Res.* **23**:2259; Couture *et al.*, 1996, *TIG* **12**:510; Noonberg *et al.*, 1994, *Nucleic Acid Res.* **22**:2830; Noonberg *et al.*, Patente en EE UU No. 5.624.803; Good *et al.*, 1997, *Gene Ther.* **4**:45; Beigelman *et al.*, Publicación Internacional PCT No. WO 96/18736. Las unidades de transcripción de ARNip anteriores se pueden incorporar en una variedad de vectores para su introducción en células de mamífero, incluyendo, pero no restringidos a, vectores de ADN plasmídico, vectores de ADN viral (tales como vectores de adenovirus o virus adenoasociados) o vectores de ARN viral (tales como vectores retrovirales o alfavirus; para una revisión véase Couture *et al.*, 1996, *TIG* **12**:510).

También se divulga un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de las moléculas de ARNip divulgadas en el presente documento, de una manera que permite la expresión de esa molécula de ARNip. En una forma de realización particular, el vector de expresión comprende: a) una región de iniciación de la transcripción; b) una región de terminación de la transcripción; y c) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una hebra de la molécula de ARNip; en donde la secuencia está operativamente unida a la región de iniciación y la región de terminación, de una manera que permite la expresión y/o administración de la molécula de ARNip.

En otra forma de realización el vector de expresión comprende: a) una región de iniciación de la transcripción; b) una región de terminación de la transcripción; c) un marco abierto de lectura; y d) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una hebra de la molécula de ARNip, en donde la secuencia está operativamente unida al extremo 3' del marco abierto de lectura; y en donde la secuencia está operativamente unida a la región de iniciación, el marco abierto de lectura y la región de terminación, de una manera que permite la expresión y/o administración de la molécula de ARNip.

En aún otra forma de realización el vector de expresión comprende: a) una región de iniciación de la transcripción; b) una región de terminación de la transcripción; c) un intrón; y d) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una hebra de la molécula de ARNip; en donde la secuencia está operativamente unida a la región de iniciación, el intrón y la región de terminación, de una manera que permite la expresión y/o administración de la molécula de ARNip.

En otra forma de realización el vector de expresión comprende: a) una región de iniciación de la transcripción; b) una región de terminación de la transcripción; c) un intrón; d) un marco abierto de lectura; y e) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una hebra de la molécula de ARNip, en donde la secuencia está operativamente unida al extremo 3' del marco abierto de lectura; y en donde la secuencia está operativamente unida a la región de iniciación, el intrón, el marco abierto de lectura y la región de terminación, de una manera que permite la expresión y/o administración de la molécula de ARNip.

En una forma de realización preferida, el crecimiento de una célula tumoral se inhibe poniendo en contacto la célula tumoral con un ARNip que inhibe S100A10. De forma alternativa, la célula tumoral se puede poner en contacto con

el ARNip en presencia de un fármaco quimioterapéutico a una concentración a la que la célula tumoral es resistente. Los ejemplos de moléculas de ARNip que son inhibidores de S100A10 incluyen, por ejemplo,

AAATG GAA CAC GCC ATG GAA A (SEQ ID NO: 59);
 AAATT CGC TGG GGA TAA AGG C (SEQ ID NO: 60); y
 AATAA TGA AGG ACC TGG ACC A (SEQ ID NO: 61).

La invención también proporciona una combinación de un agente o agentes quimioterapéutico(s) y al menos un inhibidor ARNip o ARNhc del gen celular S100A10 para su uso en la inhibición del crecimiento de una célula tumoral de cáncer de ovario. Los agentes quimioterapéuticos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, cisplatino, paclitaxel, carboplatino, etopósido, hexametilamina, melfalán y antraciclinas.

Como se usa en el presente documento el término “molécula pequeña” se refiere a una molécula que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 1500 g/mol. Una molécula pequeña puede ser, por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos o moléculas similares a péptidos. A modo de ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña puede ser un inhibidor de calpaína tal como PD 147631, éster etílico de (25,35)-trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido-3-metilbutano (E-64-d), N-acetil-leucil-leucil-norleucina (ALLN), N-Acetil-Leu-Leu-Met-al (ALLM o C₁₉H₃₅N₃O₄S), o MDL 18270; o un inhibidor de MetAP-2, tal como TNP-470 (también conocido como AGM 1470 o C₁₉H₂₈ClNO₆), fumagilina (C₂₆H₃₄O₇), cistumagilina (véase, Kwon *et al.*, 2000, *J. Antibiot.* 53:799-806), fumagalona (véase Zhou *et al.*, 2003, *J. Med. Chem.* 46:3452-3454), u ovalicina (C₁₆H₂₄O₄). Véase también Han *et al.*, 2000, *Bioorganic & Medicinal Chem. Letters* 10:39-43.

Un agente quimioterapéutico se “basa en platino” si un componente principal del agente es cisplatino o carboplatino, opcionalmente en combinación con taxol o ciclofosfamida.

También se divulgan métodos para predecir si el tumor de una paciente de cáncer de ovario es resistente al tratamiento quimioterapéutico. En estas formas de realización, los métodos comprenden los pasos de: (a) detectar una cantidad de uno o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra biológica tomada de la paciente en donde el/los gen(es) expresado(s) se muestra(n) en la tabla 1, (b) detectar una cantidad de uno o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra control, en donde el gen expresado es un gen mostrado en la tabla 1; y (c) comparar la cantidad de gen expresado o producto génico medido en el paso (a) con la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (b), en donde se predice que la paciente es resistente a quimioterapia si la cantidad detectada en el paso (a) se diferencia de la cantidad detectada en el paso (b) en un factor de al menos el 20%. En una forma de realización, la cantidad detectada puede ser una cantidad de ARNm de un gen mostrado en la tabla 1 o una cantidad de proteína codificada por un gen mostrado en la tabla 1. En otra forma de realización, la muestra control es una muestra biológica de un sujeto sensible o normal, es decir, un individuo que responde a la terapia o uno sin un cáncer, tal como cáncer de ovario. En un aspecto particular, la muestra biológica es una muestra tumoral.

En otra forma de realización, el gen expresado en el paso (a) y el paso (b) es uno o una pluralidad de S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082, y se predice que un tumor de un paciente es resistente al tratamiento quimioterapéutico si la cantidad del gen expresado en el paso (a) es al menos aproximadamente el 20% más alta que la cantidad del gen expresado en el paso (b).

Los expertos en la materia entenderán que en la práctica de los métodos de la invención, se puede evaluar la expresión del gen S100A10 identificado en el presente documento en las muestras tumorales de los pacientes. Se espera que dicho gen muestre la expresión génica diferencial usando los métodos anteriormente divulgados en un porcentaje, lo más preferiblemente en un alto porcentaje, de los tumores individuales aislados de pacientes de cáncer de ovario específico. Se espera que la confianza en los resultados obtenidos usando los métodos predictivos de la invención aumente al aumentar los números de dichos genes ensayados que muestran la expresión génica diferencial divulgada en el presente documento.

En una forma de realización, los métodos *in vitro* de la invención se pueden usar para cribar pacientes humanos en necesidad de tratamiento con quimioterapia antes de tratar realmente dichos pacientes con un agente quimioterapéutico. Por tanto, los métodos se pueden usar para cribar pacientes para permitir al personal médico determinar si un tratamiento a dicho paciente con un agente quimioterapéutico particular será ineficaz o no. Un paciente que se predice que es no resistente a la quimioterapia basándose en métodos de la invención es un candidato para el tratamiento con quimioterapia y/o un inhibidor de un gen que se muestra en la tabla 1. Un paciente que se predice que es resistente basándose en un método de la invención puede ser un candidato, entre otros, para cirugía y/o un tratamiento quimioterapéutico junto con inhibidor de un gen que se muestra en la tabla 1, u otro método de tratamiento.

En la práctica de los métodos de la invención, la expresión génica se detecta mediante detección de la cantidad del ARNm que codifica cualquiera de los genes identificados en el presente documento expresados en un amuestra

biológica, por ejemplo mediante ensayos de hibridación tales como transferencias Northern o transferencias en mancha, o mediante métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), más preferiblemente acoplada con la transcripción inversa del ARNm a ADNc (RT-PCR) e incluso más preferiblemente usando métodos conocidos en la técnica para RT-PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en más detalle en el presente documento. Otros planteamientos incluyen detectar la cantidad de un producto proteico de dicho gen o genes, en un ejemplo no limitante ensayando una muestra biológica usando antisueros específicos de proteínas, más preferiblemente anticuerpos e incluso más preferiblemente anticuerpos monoclonales específicos para cualquier gen particular identificado en el presente documento. Los niveles de expresión de proteínas también se pueden determinar ensayando la actividad enzimática o antigénica del producto proteico en una muestra biológica. Se pueden usar matrices de genes o anticuerpos para detectar la expresión de genes sobre o infraexpresados en tumores resistentes a agentes quimioterapéuticos, particularmente tumores de ovario, en donde la organización de las sondas de ácido nucleico o anticuerpos en la matriz produce un patrón reconocible, preferiblemente legible automáticamente cuando una muestra tumoral es resistente a un fármaco quimioterapéutico y/o un patrón reconocible diferente cuando la muestra tumoral es sensible a fármacos quimioterapéuticos.

Por ejemplo, se determina una cantidad de MetAP2 que se expresa en una muestra biológica de un paciente y se compara con una cantidad de MetAP2 expresada en una persona que tiene cáncer de ovario y respondió a la quimioterapia o una persona que tiene cáncer de ovario y no respondió a la quimioterapia. Como se usa en el presente documento, una persona ha “respondido a” la quimioterapia si una terapia quimioterapéutica tuvo el efecto de reducir el tamaño del tumor o parar el crecimiento del tumor. Además, el término “paciente sensible” se pretende que signifique el que después de la resección quirúrgica se trata con quimioterapia y permanece sin signos clínicos de la enfermedad durante al menos 6 meses. Si la cantidad de MetAP2 en el paciente es igual a o menor que la cantidad de MetAP2 expresada en una persona que tiene cáncer de ovario y que respondió a la quimioterapia, se predice que el paciente es sensible a ciertos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, compuestos basados en platino). Si la cantidad de MetAP2 en el paciente es mayor que la cantidad de MetAP2 expresada en una persona que tiene cáncer de ovario y que respondió a la quimioterapia, se predice que el paciente es resistente a agentes quimioterapéuticos. Asimismo, si la cantidad de MetAP2 es mayor que la cantidad de MetAP2 expresada en una persona que tiene cáncer de ovario pero no respondió a la quimioterapia, se predice que el paciente es resistente a agentes quimioterapéuticos.

Como se muestra en la tabla 1 y los ejemplos posteriormente, la expresión aumentada de MetAP2 en cáncer de ovario se asocia con la resistencia aumentada a cisplatino, agente quimioterapéutico basado en platino. Por consiguiente, los métodos descritos en el presente documento pueden predecir que el tumor de una paciente será resistente a quimioterapia basada en platino cuando la cantidad medida de MetAP2 expresada en la muestra biológica de la paciente de cáncer sea mayor que la cantidad predeterminada detectada en un individuo sensible.

También se puede predecir que el tumor de una paciente será resistente a quimioterapia basada en platino cuando la cantidad medida de MetAP2 expresada en la muestra biológica de la paciente de cáncer sea igual a la cantidad predeterminada detectada en el individuo sensible pero donde la expresión de uno o una pluralidad de genes, donde los genes son: S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1 o KIAA0082, está aumentada sobre la expresión en el paciente sensible, y/o la expresión de uno o una pluralidad de los genes HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 o MPP10 está disminuida en comparación con la expresión en el paciente sensible.

También se divulgan métodos para seguir la evolución de la enfermedad en una paciente de cáncer de ovario, particularmente una paciente de cáncer de ovario que se trata con un tratamiento quimioterapéutico, que comprende los pasos de: (a) detectar una cantidad de uno o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra biológica tomada de la paciente, en donde el gen expresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína de dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1, KIAA0082, MPP10, HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2 o MT1; (b) repetir el paso (a) usando una muestra biológica recogida posteriormente obtenida de la paciente; y (c) comparar la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (a) con la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (b), en donde la evolución de la enfermedad se sigue detectando diferencias en la cantidad de gen expresado o productos génicos en la muestra biológica recogida posteriormente comparada con la muestra biológica tomada en el paso (a). En un aspecto particular, la muestra biológica es una muestra tumoral.

Como se muestra en el presente documento, la evolución de la enfermedad se detecta cuando el/los gen(es) expresado(s) en los pasos (a) y (b) es S100A10, y la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (b) es mayor que la cantidad del gen expresado o producto génico en el paso (a). En ciertas formas de realización, la paciente se somete a tratamiento quimioterapéutico u otro durante el periodo entre la detección de la cantidad de expresión génica en el paso (a) y la cantidad detectada en el paso (b).

En ciertas formas de realización, la paciente se somete a tratamiento quimioterapéutico u otro durante el periodo entre la detección de la cantidad de expresión génica en el paso (a) y la cantidad detectada en el paso (b). En ciertas formas de realización, la cantidad detectada puede ser una cantidad del ARNm del gen S100A10 o una cantidad de la proteína codificada por el gen S100A10.

Los métodos según la invención para seguir la evolución del cáncer de ovario en una paciente se pueden usar, por ejemplo, para determinar si una paciente responde positiva o negativamente a cierta pauta de tratamiento, tal como una pauta de tratamiento quimioterapéutico.

Por ejemplo, una paciente responde negativamente donde la expresión de S100A10 es igual o mayor en una muestra biológica tomada de una paciente en un momento después de que la paciente empezara a una cierta pauta de tratamiento comparado con la cantidad del gen expresado en una muestra biológica tomada antes o en el momento en que empezó la pauta de tratamiento. En tales casos, el personal médico puede determinar que la pauta de tratamiento no es eficaz.

De forma alternativa, una paciente responde positivamente, y no se necesita cambio en el tratamiento, donde la expresión de S100A10 es menor en una muestra biológica tomada de una paciente algún tiempo después de que la paciente empezara una cierta pauta de tratamiento comparada con la cantidad del gen expresado en una muestra biológica tomada antes o en el momento en que se inició la pauta de tratamiento. un gen expresado en una muestra biológica tomada antes o en el momento en que empezó la pauta de tratamiento.

También se divulgan métodos para seguir la eficacia de una composición farmacéutica como un agente para tratar cáncer en un paciente que comprende los pasos de: (a) detectar una cantidad de uno o una pluralidad de genes expresados o productos génicos codificados por los mismos en una muestra biológica tomada de un paciente, en donde el gen expresado es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1, KIAA0082; (b) administrar una cantidad de una composición farmacéutica al paciente; (c) repetir el paso (a) usando una muestra biológica recogida posteriormente obtenida del paciente; y (d) comparar la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (a) con la cantidad de gen expresado o producto génico detectado en el paso (c), en donde la eficacia de la composición farmacéutica se sigue detectando cambios en la cantidad de gen expresado o productos génicos en la muestra biológica recogida posteriormente comparada con la muestra biológica tomada en el paso (a). Si la expresión génica es mayor que o igual a la muestra biológica recogida después del tratamiento con la composición farmacéutica que en la muestra biológica recogida antes del tratamiento con la composición farmacéutica y el crecimiento tumoral no se ha frenado, retrasado o inhibido durante el tratamiento con la composición farmacéutica, se puede considerar la composición farmacéutica ineficaz para tratar el cáncer del paciente. Por ejemplo, si la cantidad de ARNm de S100A10 es mayor en las muestras obtenidas después de haber tratado al paciente con una composición farmacéutica, se predice que el paciente es resistente a tratamiento adicional con esa composición farmacéutica. Por tanto, la composición farmacéutica se considera ineficaz contra el cáncer de ese paciente. En un aspecto particular, la muestra biológica es una muestra tumoral.

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" puede ser cualquier formulación que comprenda un compuesto (por ejemplo, una proteína, péptido, peptidomimético, molécula orgánica no peptídica, una molécula pequeña inorgánica, o una molécula de ácido nucleico) que se usa para tratar o probar la capacidad de tratar un cáncer, tal como cáncer de colon o de ovario.

También se divulgan métodos para identificar compuestos que inhiben el crecimiento de una célula tumoral, particularmente una célula tumoral quimiorresistente, y lo más particularmente una célula de cáncer de ovario quimiorresistente. En estas formas de realización, el método comprende los pasos de: (a) poner en contacto una célula que expresa uno o una pluralidad de genes que se sobreexpresan en células de cáncer de ovario quimiorresistentes con un compuesto de prueba, en donde el gen es S100A10, S100A11, calpaína 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, dedos fusionados, NM23D, ADAR1, grancalcina, NBR1, SAPK/Erk1, proteína con dedo de zinc-262 MYM, HYA22, MRPL4, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, quinasa FAST, TESK2, SRB1, KIAA0082; (b) detectar la expresión del gen en presencia o ausencia del compuesto de prueba; y (c) comparar la expresión del gen en presencia del compuesto con la expresión del gen en ausencia del compuesto de prueba, en donde un compuesto se identifica como un compuesto que inhibe el crecimiento de una célula tumoral quimiorresistente si la expresión del gen en presencia del compuesto de prueba se reduce relativa a la expresión del gen en ausencia del compuesto de prueba. En un aspecto particular, la muestra biológica es una muestra tumoral. En ciertas formas de realización, el compuesto puede inhibir el crecimiento de la célula tumoral en presencia de un fármaco quimioterapéutico.

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados alcanzados, se proporcionan para fines ilustrativos solo y no se deben interpretar como limitantes de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1**Ensayos de proliferación celular de MTT**

- 5 Se ordenaron cinco líneas celulares de cáncer de ovario (OVCA 429, OVCA 433, OVCA 432, HEY y HEYA8) según sus niveles de sensibilidad a cisplatino usando ensayos de proliferación de MTT estándar.

Las células se cultivaron en medio de Eagle mínimo (MEM) obtenido de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), suero bovino fetal (SBF, inactivado por calor) al 5%, mezcla de antibióticos/antimicóticos al 1% (Invitrogen). La solución madre de MTT (5 mg/ml; CALBIOCHEM, San Diego, CA) se preparó disolviendo colorante en HBSS (solución de sales equilibrada de Hank), filtrando dicha mezcla y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20°C. Se usó un ml de solución madre de MTT para cada 9 ml de medio (el volumen total es 10 ml). Las placas se cubrieron con un recubrimiento opaco para proteger las células de la luz.

- 15 Cada línea celular se trató con cisplatino 5, 25, 50, 100 y 200 μ M durante 4, 8 y 24 horas. Los ensayos de MTT se realizaron 96 horas después del tratamiento con cisplatino en placas de 96 pocillos. El medio se eliminó de las células y se añadieron 200 μ l de medio MTT fresco a las células y también a los pocillos blanco que sirvieron como controles. Las células se incubaron en condiciones normales de cultivo durante 3-4 horas. Se comprobó después la formación de cristales de formazán en las células, una indicación de actividad metabólica. El medio se eliminó y se añadieron 200 μ l de 2-propanol a los pocillos y pocillos control. Después de que todos los cristales se hubieran disuelto homogéneamente, las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Los resultados se leyeron en un lector de microplacas a 570 nm.

- 25 La figura 39 (panel superior) muestra los resultados del ensayo de MTT para las 5 líneas celulares de cáncer de ovario usadas en estos estudios después de 4 horas de exposición a cisplatino a varias concentraciones. Después de considerar el rendimiento de cada línea celular en el intervalo entero de concentraciones de cisplatino y tiempos de tratamiento usados, las células se ordenaron en nivel decreciente de resistente como OVCA 429 < OVCA 433 < HEY A8 < OVCA 432 < HEY (panel inferior).

- 30 Se realizaron ensayos de MTT que implicaban la exposición de las células a un ARNip o fármaco inhibidor para un gen particular esencialmente como se describe anteriormente. Las células se pretrataron con los ARNip durante 48 horas antes del tratamiento con cisplatino 0, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 μ M durante 24 horas. Para los experimentos de tratamiento de combinaciones de fármacos (fumagilina o ALLN) las células se expusieron a un tratamiento de combinación de concentraciones crecientes del fármaco que se ensayaba y cisplatino 0, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 μ M durante 24 horas.

Ejemplo 2**Análisis por micromatriz de ADNc, transferencia Northern y PCR en tiempo real cuantitativa**

- 40 Se usaron las líneas celulares caracterizadas en el ejemplo 1 para realizar análisis en micromatrices. Se recogieron precipitados celulares de cada línea celular y se aisló el ARN de las células disolviendo los precipitados en 1 ml de reactivo TRI (Obtenido de Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) o Trizol (Invitrogen). Las muestras se dejaron después reposar durante 5 minutos. Se logró la separación de las fases añadiendo 100 μ l de 1-bromo-3-cloropropano (BCP) a la muestra. Después de agitar durante 15 segundos, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se centrifugaron durante 16 minutos a 13.000 RCF a 4-25°C. El sobrenadante se retiró con una pipeta y se colocó en un tubo de microcentrífuga nuevo. El ARN se precipitó después mezclando el sobrenadante con 500 μ l de isopropanol fresco, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó durante 9 minutos a 13.000 RCF a 4-25°C. El sobrenadante se retiró entonces del tubo y el precipitado se lavó añadiendo al tubo 1 ml de etanol al 75%, agitando con el vórtex y después centrifugando durante 6 minutos a 13.000 RCF a 4-25°C. El líquido se eliminó y el precipitado se secó al aire durante aproximadamente 8 minutos. El precipitado se disolvió después en agua sin RNasa y se colocó en hielo para su uso inmediato o se almacenó a -80°C.

- 55 Se usaron micromatrices (obtenidas de Research Genetics Inc.) que contenían más de 5000 clones de ADNc de secuencia verificada para indagar la expresión génica en estas células; todos los ensayos en micromatrices se realizaron según las instrucciones del fabricante. Se sabía que cada clon se expresaba en tejido ovárico. Se usó la expresión génica en la línea más resistente (OVCA 429) como un estándar con el que se comparó la expresión génica en las otras líneas celulares. El análisis de los datos reveló que OVCA 429 expresaba 196 genes a niveles aumentados y 83 genes expresados a niveles disminuidos comparados con las líneas celulares más sensibles.

- 60 Se seleccionaron genes para análisis posteriores solo si satisfacían los siguientes criterios: una diferencia de al menos 2 veces en expresión comparada con el estándar detectado en membranas duplicadas; expresión diferencial detectada en 3 de 4 líneas celulares comparado con el estándar (OVCA 429); y niveles de expresión consistentes con la sensibilidad a cisplatino de cada línea celular. Los genes sobreexpresados se expresaban más altamente en

células OVCA 429 y la expresión disminuía gradualmente hasta que se alcanzó el nivel de expresión más bajo en la línea celular menos resistente HEY (y viceversa para genes expresados a niveles menores en células OVCA 429).

El análisis por transferencia Northern y el análisis por PCR en tiempo real cuantitativa de los genes que se expresaban diferencialmente (niveles mayores o menores) en la línea celular más resistente (OVCA 429) cuando se comparaban con las otras líneas celulares se usaron para validar los datos de las micromatrices e identificar genes de interés para análisis posteriores. Los genes identificados se enumeran en la tabla 2, que muestra el nombre del gen, un resumen del patrón de expresión en las líneas celulares y la figura que presenta los resultados de los análisis de expresión.

Tabla 2

No. de acceso de Genbank	No. de ID del ADNc en GeneCard	Nombres	Patrón de expresión validado en líneas celulares	Figura
BC015973	756595	S100A10 p11 CLP11 cadena ligera de calpactina 1 42 C	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	1
BC001410	810612	S100A11 S100C Calgizarina	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	2
AF261089	549728	Calpaína 2 CANPL2 MCANP	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	6
BC004974	250654	SPARC Osteonectina BM-40	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	4
BC013782	39093	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	8
BC015525	809784	KLK6 Zima Neurosina Proteasa M	Aumenta con la resistencia aumentada a cisplatino	17
AF222689	246120	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino	18
U31913	814731	ARA9 XAP2	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	19
D83735	713886	Calponina 2	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	20
U19251	1046522	NAIP	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino	21
BC005291	306921	eEF1ε p18	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino	13
AF015608	897594	RNPS1	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	22
U49436	884867	eIF5 eIF5A	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	10
BC013590	1630998	eIF2Bε	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	12
M65217	669443	HSF2 HSTF2	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	23
AB010427	714196	WDR1 NORI-1	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	24
BC001134	321247	dedos fusionados (Ft1)	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	25
BC004880	203003	NM23D mn23-H4	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	26
U10439	950367	ADAR1	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	27

No. de acceso de Genbank	No. de ID del ADNc en GeneCard	Nombres	Patrón de expresión validado en líneas celulares	Figura
BC005214	34140	Grancalcina	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	7
BC009808	882511; M17S2	NBR1	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	28
L36870	726147	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	14
AB007885	427980	Proteína de dedo de zinc-262 MYM	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	29
D88153	123980	HYA22	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	31
AB049635	824568	MRPL4 CGI-28	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	30
AF037261	1636620	Vinexina β	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	32
M59818	809639	G-CSFR	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	33
BC015710	838636	RAB22A	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino	36
BC017201	68605	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	35
BC011770	345077	Quinasa FAST	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	16
AB057597	845441	TESK2	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	15
BC022087	756687	SRB1 CLA1 CD36L1	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	34
BC031890	825293	KIAA0082	Aumentada con la resistencia aumentada a cisplatino	37
NM_006312	743230; NCOR2	NCOR2	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino	38
BC032338	297392	MT1	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino	51
X98494	825214	MPP10	Disminuida con la resistencia aumentada a cisplatino	52

* GenCard es una marca registrada del Instituto Weizmann de Ciencias en Rehovot, Israel y los registros numéricos se pueden cambiar en cualquier momento.

Análisis por transferencia Northern

5 Para confirmar los patrones de expresión identificados por el análisis en micromatrices, se realizaron transferencias Northern usando el protocolo NorthernMax (Ambion Corp., Austin, TX) y las sondas de ADN se marcaron usando kits de marcaje de ADN Strip-EZ (Ambion) según las instrucciones del fabricante.

PCR en tiempo real cuantitativa

10 Se sintetizó el ADNc mezclando 1 μ g de ARN celular total aislado de líneas celulares de cáncer de ovario, 1 μ l de oligo dT y agua hasta un volumen final de 12 μ l, incubando esta mezcla a 70°C durante diez minutos y después añadiendo a la mezcla 5 μ l de mezcla de reacción 2 X, DTT 2 μ M y 1 μ l de enzima Superscript II (Invitrogen). La
15 mezcla de reacción se incubó entonces a 42°C durante 60 minutos. Se prepararon diluciones del ADNc de 1:4 a 1:256. Se prepararon mezclas maestras con un volumen final de 50 μ l/pocillo usando el QuantiTect SYBR Green PCR Handbook de Qiagen (Qiagen Corp., Valencia, CA). Para cada pocillo de una placa que se usó, se añadieron 25 μ l de mezcla maestra QuantiTect SYBR Green PCR 2X (Qiagen), 0,3 μ M del cebador directo, 0,3 μ M del cebador inverso y agua sin RNasa hasta un volumen final de 45 μ l.

20 Las mezclas maestras para cada gen se mezclaron por completo y se repartieron volúmenes apropiados en tubos o placas de PCR como sigue: sin molde (control) = 45 μ l de mezcla génica maestra + 5 μ l de H₂O; blanco de tampón =

25 µl de H₂O + 25 µl de mezcla SYBR; y muestras de prueba = 45 µl de mezcla génica maestra + 5 µl de ADNc (diluido como antes).

Se determinó la detección de secuencia usando un sistema de detección de la secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) o el sistema Opticon II de MJ Research (Waltham, MA) como sigue: el paso de activación inicial de PCR se llevó a cabo durante 15 minutos a 95°C; las muestras se desnaturalizaron durante 15 segundos a 94°C, se hibridaron durante 30 segundos a 53°C (55°C cuando se usó el sistema Opticon II) y se extendieron durante 30 segundos a 72°C (los datos se adquirieron durante este paso); la reacción de PCR se repitió durante 50 ciclos. Se preparó un análisis de la curva de fusión añadiendo los siguientes pasos: 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 20 segundos a 95°C.

Además, se preparó ARN de muestras de tejidos obtenidas de pacientes con cáncer de ovario quimiosensibles (es decir que responden) o quimiorresistentes (es decir, que no responden) que habían sido tratadas con agentes quimioterapéuticos basados en platino. El ARN se aisló por homogenización de 50-100 mg de muestras de tejido en 1 ml de reactivo TRI o Trizol hasta que los tejidos se licuaron. Las muestras se dejaron reposar después durante 5 minutos. La separación de las fases se logró añadiendo 100 µl de BCP a la muestra. Después de agitar durante 15 segundos, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se centrifugaron durante 9 minutos a 13.000 x g (fuerza centrífuga relativa, RCF) a 4-25°C. El sobrenadante se retiró con una pipeta y se colocó en un tubo de microcentrífuga nuevo. El ARN se precipitó después mezclando el sobrenadante con 500 µl de isopropanol fresco, se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se centrifugó durante 9 minutos a 13.000 RCF a 4-25°C. El sobrenadante se retiró entonces del tubo y el precipitado se lavó añadiendo al tubo 1 ml de etanol al 75%, agitando con el vórtex y después centrifugando durante 6 minutos a 13.000 RCF a 4-25°C. El líquido se eliminó y el precipitado se secó al aire durante aproximadamente 8 minutos. El precipitado se disolvió después en agua sin RNasa y se colocó en hielo para su uso inmediato o se almacenó a -80°C.

Se realizó la PCR en tiempo real cuantitativa usando cebadores para los genes mostrados en la tabla 3 para detectar cambios en la expresión génica entre pacientes quimiosensibles y quimiorresistentes. Se usó la expresión del ARN de 18S para corregir los valores de los genes expresados. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación. Los resultados confirman las observaciones de los experimentos realizados con ARN de líneas celulares.

Tabla 3

Nombre del gen	# de acceso de GenBank	Veces de expresión en pacientes quimiosensibles	Veces de expresión en pacientes quimiorresistentes	Veces de diferencia
Vinexina β	AF037261	1,4	2,8	2,0
G-CSFR	M59818	1,7	2,6	1,5
KLK6	BC015525	0,3	3,3	11,0
SPARC	BC004974	3,6	6,0	1,7
HYA22	D88153	1,75	2,4	1,4
MRPL4	AB049635	0,3	0,8	2,7
eIF5	U49436	0,8	1,3	1,6
RAB22A	BC015710	0,15	0,075	2,0*
MT1	BC032338	0,9	0,6	1,5*
MYM	AB007885	0,6	1,5	2,5
RNPS1	AF015608	0,7	1,4	2,0
S100A11	BC001410	1,0	2,0	2,0
MetAP2	BC013782	0,175	0,21	1,2
S100A10	BC015973	0,15	0,25	1,7
SAPK	L36870	0,40	0,95	2,4
Calpaína 2	AF261089	0,12	0,19	1,6
NM23D	BC004880	0,70	1,3	1,9
NIAP	U19251	4	2	2,0*
SRB1	BC022087	0,08	0,13	1,6
WDR1	AB010427	1,5	5	3,3
HMT1	AF222689	0,19	0,05	3,8*
eEF1	BC005291	0,65	0,15	4,3*
eIF2B	BC013590	0,40	0,75	1,9
ADAR1	U10439	0,65	0,8	1,2

* esta diferencia refleja un descenso en la expresión génica en las pacientes quimiorresistentes.

Se usaron las siguientes secuencias de cebadores para validar la expresión génica usando PCR en tiempo real:

250654 (este gen se validó inicialmente con una sonda de baliza molecular, sin embargo, estudios posteriores se llevaron a cabo con SYBR green)

Validación con baliza molecular:

Baliza: FAM-CGCGTATGAACTGGGCTTATGTGACGCG-DABCYL (SEQ ID NO: 13)
 Cebador flanqueante directo: CTGGGCTCTGCCTTAAACAC (SEQ ID NO: 14)
 5 Cebador flanqueante inverso: GCTCCCAAAAGTTTGAACCA (SEQ ID NO: 15)
 Cebador interno directo: TTGCCTGAGGCTGTAACCTGA (SEQ ID NO: 16)
 Cebador interno inverso: GCTCCCAAAAGTTTGAACCA (SEQ ID NO: 62)

Para SYBR green:

10 directo: CCA CTT CTT TGC CAC AAA GT (SEQ ID NO: 17)
 inverso: GAA TTC GGT CAG CTC AGA GT (SEQ ID NO: 18)

810612 (este gen se validó inicialmente con una sonda de baliza molecular)

15 Baliza: FAM-CGCCTGGGTGGGTTTGAAGGAGGCG-DABCYL, (SEQ ID NO: 19)
 Cebador flanqueante directo: ATCGAGTCCCTGATTGCTGT (SEQ ID NO: 20)
 Cebador flanqueante inverso: GCCTGCATGAGGTGGTTAGT (SEQ ID NO: 21)
 Cebador interno directo: CTTGCCATGACTCCTTCCTC (SEQ ID NO: 22)
 20 Cebador interno inverso: GCCTGCATGAGGTGGTTAGT (SEQ ID NO: 63)

39093

directo: GCA GAA GCA CAT CGA CAA GT (SEQ ID NO: 23)
 inverso: GCC TGC ATT TAA TCC ATT CTC (SEQ ID NO: 24)

25 **882511**

directo: TAA CCA CGT CCT GCT GAA GT (SEQ ID NO: 25)
 inverso: GCT TTA AGA AAG TTC TTA TCA AC (SEQ ID NO: 26)

950367

30 directo: GCA CAG CGG AGT GGT AAG A (SEQ ID NO: 27)
 inverso: CAG AGG AGT CAG ACA CAT TG (SEQ ID NO: 28)

34140

35 directo: GTA TAC TTA CTT CAG TGC TGT T (SEQ ID NO: 29)
 inverso: CAT TCT TGC TAT AAC GTT TAA CA (SEQ ID NO: 30)

726147

40 directo: CTC TGT GAC TTC GGC ATC A (SEQ ID NO: 31)
 inverso: CAG ACA TCA GAG CGG ACA T (SEQ ID NO: 32)

427980

directo: AAG AAC TGG GTT CAG TGG AAA (SEQ ID NO: 33)
 inverso: GAG AGT GCA TGG TCT TGA GT (SEQ ID NO: 34)

45 **123980**

directo: AGC CAC CAG CTA AGT ACC TT (SEQ ID NO: 35)
 inverso: CAT CGA TTT CAA CCG GAA CAA (SEQ ID NO: 36)

824568

50 directo: GTG TGT GGA CCT CCA TGT TA (SEQ ID NO: 37)
 inverso: AGC ACA CCA TTA CAG ACA AGT (SEQ ID NO: 38)

1636620

55 directo: GGA ACC AGT TTC TGC AGG AA (SEQ ID NO: 39)
 inverso: CTC CAG CAG CAC CTC AAT G (SEQ ID NO: 40)

809639

60 directo: ATC CAA GGT TAT GTG GTT TCT T (SEQ ID NO: 41)
 inverso: CAC CTC CTG GGC TTC TGA A (SEQ ID NO: 42)

756687

directo: GAT CCA TGA AGC TAA TGT ACA A (SEQ ID NO: 43)
 inverso: ACG GGC AGA AGC CTT CGT T (SEQ ID NO: 44)

65 **845441**

directo: CCT GAG GTT CTC CGA GAT G (SEQ ID NO: 45)

inverso: TCC AGC CCG AAA TTC TCT GT (SEQ ID NO: 46)

68605

directo: CAA GAG GCG GAA GGG TAA A (SEQ ID NO: 47)

5 inverso 1: CAG CCG CTC GGG TAG GT (SEQ ID NO: 48)

inverso 2: CAC TAT GGA AGG ACC TTG CT (SEQ ID NO: 49)

838636

directo: GGA TAC AGG TGT AGG TAA ATC (SEQ ID NO: 50)

10 inverso: TCC CAG ATT AGG AAT TTA TGT A (SEQ ID NO: 51)

345077

directo: CTT CTG GAA CAG GCG AAG A (SEQ ID NO: 52)

inverso 1: GCT GGC CCA GAC GAC GAA (SEQ ID NO: 53)

15 inverso 2: GCA GAC ACA CGT GGA TGG T (SEQ ID NO: 54)

825214

directo: GAT GAA GTT AAA TCC TCC TTT G (SEQ ID NO: 55)

20 inverso: CCT CTT CTG TGC TGT CAC TT (SEQ ID NO: 56)

297392

directo: CCT GCA AGA AGA GCT GCT G (SEQ ID NO: 57)

inverso: CAC AGC TGT CCT GGC ATC A (SEQ ID NO: 58)

897594

directo: AGC ACC AGC ACT GGC TCA TCA A (SEQ ID NO 109)

25 inverso: AGA GCC AGA AGA GCT GCT A (SEQ ID NO 110)

713886

30 directo: AAC CGA CAA GTG TGA CAA CT (SEQ ID NO 111)

inverso: TGT GCC TTG CGG GCA GTA (SEQ ID NO 112)

884867

directo: C ACC ACC ACC ACC AAA TGA A (SEQ ID NO 113)

35 inverso: CA TCC ATT CGA CGC CTT TGA (SEQ ID NO 114)

321247

directo: CCA GCA GCA CAG TCA ACA AA (SEQ ID NO 115)

40 inverso: TGG TAG CTT CTG CTT CAC AA (SEQ ID NO 116)

1630998

directo: CCA GAG CTG CAC TCA TTC C (SEQ ID NO 117)

inverso: CAC TGT TGG TGA TAA AGC AAT T (SEQ ID NO 118)

756595

45 directo: GGA TAA AGG CTA CTT AAC AAA G (SEQ ID NO 119)

inverso: CCA CTT TGC CAT CTC TAC AC (SEQ ID NO 120)

549728

50 directo: GAG CCG AGG AGG TTG AAA G (SEQ ID NO 121)

inverso: CTC CTC TGG GTC TAT AGT GT (SEQ ID NO 122)

203003

directo: GAC CCT GGT GGC GGT GAA (SEQ ID NO 123)

55 inverso: GGT GCC TGC AGC ATC TTC A (SEQ ID NO 124)

814731

directo: GGA GAG CCC TGG CAC GTA (SEQ ID NO 125)

60 inverso: CCT TCA TCT GCA GGT TCT TG (SEQ ID NO 126)

714196

directo: ACG ACG GAC ACA TTA ATT ACT (SEQ ID NO 127)

inverso: TCC ATG CTG CAG CTG ATG A (SEQ ID NO 128)

809784

65 directo: C CTT CGG CAA AGG GAG AGT (SEQ ID NO 128)

inverso: CTG GAT GAG TTC AGA GAG TTT (SEQ ID NO 130)

825293

directo: GCC TCG ACA GGC AGA GAT (SEQ ID NO 131)

inverso: CTT GTA GCT GAA GAT GTC AAT (SEQ ID NO 132)

246120

directo: CTC TAT GCC CGG GAC AAG T (SEQ ID NO 133)

inverso: AAG ACA TGT CGA AGC CAT ACA (SEQ ID NO 134)

Resumen de genes aumentados o disminuidos en células de cáncer de ovario que son resistentes a cisplatino

Genes que codifican proteínas con mano EF:

Se identificaron cinco genes que codifican proteínas con mano EF activadas por calcio, es decir, S100A10, S100A11, SPARC, calpaína 2 y grancalcina. Dos de los cuatro genes, S100A10 y S100A11, están localizados adyacentes entre sí en el cromosoma 1 en 1q21 (Pejovic, 1995, *Ann. Med.* 27:73-78; Ridinger *et al.*, 1998, *Biochimica et Biophysica Acta* 1448:254-263). Se ha descrito esta región del cromosoma 1 como uno de los focos para reorganizaciones cromosómicas en cáncer de ovario (Pejovic, 1995, *Ann. Med.* 27:73-78). Las funciones biológicas exactas de S100A10 y S100A11 no se conocen. S100A10 y S100A11 se expresan ambas a niveles mayores en líneas celulares de cáncer de ovario más resistentes (véanse la figura 1 y la figura 2, respectivamente). La figura 3 muestra que los ARNm para S100A10 y S100A11 también están elevados en un paciente que es más resistente a quimioterapia comparado con uno más sensible.

SPARC (también conocida como osteonectina y BM40) es una proteína secretada (Lane y Sage, 1994, *FASEB J.* 8:163-173). Se ha mostrado que SPARC se expresa a niveles altos en el estroma de ovarios neoplásicos (Paley *et al.*, 2000, *Gynecologic Oncology* 78:336-341) y se ha mostrado que induce apoptosis en células de cáncer de ovario (Yiu *et al.*, 2001, *Am. J. Pathol.* 159:609-622). Sin embargo, se han detectado niveles altos de SPARC en melanoma (Ledda *et al.*, 1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:210-214) y cáncer colorrectal (Porte *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 64:70-5), y también se ha descrito que fomenta la migración celular e invasión en cáncer de próstata (Thomas *et al.*, 2000, *Clin. Cancer Res.* 6:1140-9) y glioblastoma (Golembieski *et al.*, 1999, *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:463-72). La sobreexpresión de SPARC también contribuye a la motilidad e invasión aumentadas de células de cáncer de mama (Briggs *et al.*, 2002, *Oncogene* 21:7077-91). Como se muestra en el presente documento, se encontró que SPARC se expresaba a niveles mayores en las líneas celulares de cáncer de ovario más quimiorresistentes (figura 4). El ARNm de SPARC también estaba elevado en muestras tomadas de una paciente cuyo tumor había reaparecido como se muestra en la figura 5.

La calpaína 2 es una proteasa activada por calcio. Recientemente se ha descrito que un inhibidor de la actividad calpaína 2 inducía apoptosis en leucemia linfoblástica aguda y linfoma no de Hodgkin humanos así como en células de tumores sólidos (Huang y Wang, 2001, *TRENDS in Molecular Medicine* 7:355). Los niveles del ARNm de calpaína 2 estaban aumentados en las líneas celulares de cáncer de ovario más quimiorresistentes (figura 6).

La grancalcina es una proteína de unión a Ca^{2+} recientemente descrita que pertenece a la subfamilia de penta-mano EF de proteínas con mano EF y se transloca a las membranas tras la unión a Ca^{2+} (Lollike *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:17762-9). Se encontró que el ARNm de grancalcina estaba elevado en las líneas celulares más resistentes a cisplatino comparado con las líneas celulares más sensibles al tratamiento con cisplatino (figura 7).

Genes que codifican proteínas implicadas en la traducción de proteínas y control traduccional:

MetAP2: La expresión de la metionina aminopeptidasa 2 (también conocida como p67 asociada con eIF2) nunca se ha conectado con el cáncer de ovario. La proteína codificada por este gen parece tener dos funciones. Elimina la primera metionina de las proteínas recién sintetizadas (Li y Chang, 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227:152-9) y también se asocia con el factor de iniciación eucariota 2 α (eIF-2 α ; una proteína de unión a GTP) e inhibe su fosforilación (Wu *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* 268:10796-10801). Usando un anticuerpo contra MetAP2, parece que la expresión de MetAP2 está elevada en la línea celular más resistente OVCA 429 y disminuida en Hey (la línea celular más sensible a cisplatino; véase la figura 8). Además, cuando se examinó la expresión del ARNm de MetAP2 en muestras de tejidos obtenidas de tres pacientes con diferentes niveles de resistencia a quimioterapia basada en cisplatino, MetAP2 parecía estar más elevada en la muestra del paciente más resistente (CAP3 en la figura 9) comparado con los pacientes con niveles de resistencia intermedio (CAP2; figura 9) y bajo (CAP1; figura 9) a quimioterapia. Un fármaco, TNP-470, que se dirige específicamente a MetAP2 está actualmente en ensayos clínicos como un inhibidor de angiogénesis en varios tumores humanos (Kruger y Figg, 2000, *Expert Opin. Investig. Drugs* 9:1383-96). Además, se ha mostrado que disminuir los niveles celulares de MetAP2 usando oligonucleótidos antisentido induce apoptosis (Datta y Datta, 1999, *Exp. Cell Res.* 246:376-83). Estas observaciones sugieren que esta proteína podría ser una diana importante para terapia en cáncer de ovario.

eIF5 es otra proteína central para la iniciación de la traducción y la síntesis de proteínas que funciona como una proteína activadora de GTPasa (Paulin *et al.*, 2001, *Current Biol.* 11:55-9; Das *et al.*, 2001, *J. Bio. Chem.* 276:6720-6). Se detectaron dos transcritos y los niveles de expresión de ambos estaban elevados en líneas celulares de cáncer de ovario con el mayor nivel de resistencia a cisplatino (figura 10) y en una paciente más resistente (figura 11).

El ARNm para eIF2B ϵ está aumentado en líneas celulares de cáncer de ovario que muestran la mayor resistencia a cisplatino (figura 12). La proteína codificada por este gen es la subunidad reguladora de un complejo del factor de intercambio del nucleótido de guanina que comprende 5 subunidades (Proud, 2001, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 26:95-114).

El ARNm de eEF1 ϵ estaba disminuido en líneas celulares de cáncer de ovario que muestran el nivel de resistencia más alto a cisplatino (figura 13). Los eEF están implicados en el ensamblaje polipeptídico (Browne y Proud, 2002, *Eur. J. Biochem.* 269: 5360-8).

Quinasas:

SAPK/Erk quinasa 1 es una quinasa de especificidad dual que activa JNK1, JNK2 y p38 pero no Erk1 o Erk2 (Cuenda, 2000, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:581-7). Este gen y su proteína no se han asociado hasta ahora con cáncer de ovario. Se encontró que los niveles de ARNm para este gen estaban elevados en las líneas celulares más resistentes comparadas con las líneas celulares sensibles (figura 14).

TESK2: esta serina/treonina quinasa se localiza predominantemente en el núcleo celular. Sin embargo, cuando está inactiva se transloca al citoplasma. TESK2 fosforila específicamente cofilina (en Ser-3), una proteína que, junto con el factor despolimerizante de actina desempeña un papel esencial en el recambio rápido de filamentos de actina y reorganización basada en actina estimulando la despolimerización y ruptura de filamentos de actina (Toshima, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:31449-58). No ha descrito conexión anterior con el cáncer de ovario. El ARNm de TESK2 está elevado en las líneas celulares más resistentes (figura 15).

Quinasa FAST: Esta es un serina/treonina quinasa activada por Fas, que se piensa que está implicada en la apoptosis mediada por Fas (Tian *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* 182:865-74). El ARNm de la quinasa FAST está elevado en las líneas celulares más quimiorresistentes (figura 16).

Otras:

KLK6: Esta es una serina proteasa también conocida como zima y neurosina. Este gen pertenece a la familia de genes de calicreína humana, que también incluye moléculas mejor conocidas tal como el antígeno específico de próstata (PSA) que ya se usa como un marcador para el cáncer de próstata y también se investiga como marcador para el cáncer de ovario (Diamandis, 2000, *Clinical Biochem.* 33:579-83). Se han descrito niveles elevados en suero de KLK6 en pacientes con cáncer de ovario comparado con controles normales (Diamandis, 2000, *Clinical Biochem.* 33:579-83). Los niveles de expresión de este gen estaban elevados en las líneas celulares más quimiorresistentes probadas (figura 17). También merece la pena hacer notar que este gen está localizado en otra área de reorganizaciones cromosómicas frecuentes en cáncer de ovario (Pejovic, 1995, *Ann. Med* 27:73-78).

HMT1 (también conocida como PRMT1): Este gen codifica una proteína arginina N-metiltransferasa, la expresión de dos variantes del cual se encontraron disminuidas en cáncer de mama (Scorlis *et al.*, 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278:349-59). La expresión de HMT1 estaba disminuida en células que eran más resistentes a cisplatino (véase la figura 18). También es interesante notar que HMT1 está localizado en el cromosoma 19 en 19q13.3 en la misma región cromosómica donde el gen que codifica residuos de KLK6.

Se piensa que ARA9 (también conocida como proteína que interacciona en el receptor de arilhidrocarburo (AIP) y XAP2) desempeña un papel en la señalización medida por AHR (Kazlauskas *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277:11795-801). El ARNm de este gen estaba elevado en líneas celulares más resistentes a cisplatino (figura 19). También está localizada en el cromosoma 11 (en 11q13.3), otra área con frecuencia aumentada de reorganizaciones cromosómicas asociada con cáncer de ovario (Pejovic, 1995, *Ann. Med* 27:73-78).

La calponina 2 se ha estudiado en carcinomas mioepiteliales (Mosunjac *et al.*, 2000, *Diagn. Cytopathol.* 23:151-5) pero no en cáncer de ovario. La expresión de calponina 2 estaba ligeramente elevada en las líneas celulares más resistentes a cisplatino comparada con las líneas celulares de cáncer de ovario más sensibles (figura 20).

Se encontró que la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP) estaba ligeramente disminuida en las líneas celulares más resistentes a cisplatino (figura 21). NAIP nunca se ha relacionado con cáncer de ovario (Tamm *et al.*, 2000, *Clin. Cancer Res.* 6:1796-1803).

La proteína de unión a ARN S1 (RNPS1) es un activador general de ajuste de pre-ARNm y puede formar un complejo con ASAP que está implicada en el fomento de la apoptosis y el antígeno de rechazo de tumores SART3

(Schwerk *et al.*, 2003, *Mol. Cell Biol.* 23:2981-90; Harada *et al.*, 2001, *Int. J. Cancer* 93:623-8). Se encontró que sus niveles estaban elevados en las líneas celulares resistentes a cisplatino (figura 22).

El factor de transcripción de choque térmico 2 (HSF2) regula la expresión de los genes de proteínas de choque térmico (Mathew *et al.*, 1998, *Mol. Cell Biol.* 18:5091-8). También parece que HSF2 es capaz de competir con la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) para unirse a su subunidad reguladora PR65, y se piensa que actúa como una nueva proteína reguladora de PP2A (Hong *et al.*, 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:84-9). Los niveles de ARNm para HSF2 estaban elevados en las líneas celulares más resistentes (figura 23).

WDR1: La proteínas con repeticiones WD se encuentran en todos los eucariotas y desempeñan un papel importante en la regulación de una amplia variedad de funciones celulares incluyendo transducción de señales, transcripción y proliferación (Li *et al.*, 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274:117-23). Sin embargo, la función exacta de WDR1 es desconocida. El ARNm para este gen estaba elevado en las líneas celulares más resistentes comparadas con las líneas celulares más sensibles (figura 24).

Ft1: El marco abierto de lectura de este gen muestra similitudes a las enzimas de conjugación de ubiquitina y en ratones mapea cerca del gen de p130 relacionada con Rb (Lesche *et al.*, 1997, *Mamm. Genome* 8:879-83). Citogenéticamente Ft1 mapea en el cromosoma 16 en la región 16q12.2, un área repetidamente alterada en cáncer humano. Se ha descrito la pérdida de heterocigosidad en esta región cromosómica en cáncer de ovario. Los niveles del ARNm de Ft1 estaban elevados en las líneas celulares que son más resistentes a cisplatino (figura 25).

NME4 (también conocida como nm23-h4) es una nucleósido difosfato quinasa que está moderadamente sobreexpresada en carcinoma de células renales y fuertemente sobreexpresada en carcinomas colorrectales (Hayer *et al.*, 2001, *Anticancer Res.* 21:2821-5). El ARNm de NME4 estaba elevado en las líneas celulares más resistentes (figura 26).

ADAR1: La edición de ARN de adenosina a inosina por las adenosina desaminasas incluyendo ADAR1 produce la creación de sitios alternativos de ajuste o alteraciones de codones y, por tanto, produce cambios funcionales en las proteínas (Wang *et al.*, 2000, *Science* 290:1765). También es interesante notar que el gen ADAR1 está localizado en el cromosoma 1 en 1q21.1-q21.2, en la misma región cromosómica frecuentemente reorganizada que S100A10 y S100A11 (Pejovic, 1995, *Ann. Med* 27:73-78). El ARNm de ADAR1 estaba elevado en líneas celulares que son más resistentes a cisplatino (figura 27).

NBR1: La función molecular exacta de NBR1 se desconoce. (Los expertos en la materia reconocerán que la utilidad de un gen en los métodos divulgados en el presente documento no depende de una noción detallada o exacta de las propiedades funcionales de un gen). Estudios de mapeo han revelado que el gen NBR1 está cabeza con cabeza con el gen BRCA1 (Whitehouse *et al.*, 2002, *Eur. J. Biochem.* 269:538-45). NBR1 no tiene asociación descrita con cáncer de ovario. El ARNm de BRCA1 estaba elevado en la línea celular más resistente a cisplatino OVCA 429 (figura 28).

Proteína con dedo de zinc 262/MYM: Un miembro de una familia de genes que codifican proteínas que contienen el motivo de unión a zinc MYM (Smedley *et al.*, 1999, *Genomics* 60:244-7). Esta proteína nunca se ha asociado con cáncer de ovario; sin embargo, el ARNm para este gen estaba elevado en la línea celular más quimiorresistente comparada con las otras líneas celulares probadas (figura 29).

MRPL4: Este gen y su proteína nunca se han asociado con cáncer de ovario. Sin embargo, el gen está localizado en el cromosoma 19 en 19p13.2, un región frecuentemente reorganizada en cáncer de ovario (Pejovic, 1995, *Ann. Med* 27:73-78). El ARNm de RPL4 estaba elevado en las líneas celulares quimiorresistentes (figura 30).

HYA22: Este gen y su proteína nunca se han asociado con cáncer de ovario. Sin embargo, el gen está localizado en el cromosoma 3 en 3p21.3, una región asociada con reorganizaciones cromosómicas en cáncer de ovario (Pejovic, 1995, *Ann. Med* 27:73-78; Protopopov *et al.*, 2003, *Cancer Res.* 63:404-12; Senchenko *et al.*, 2003, *Oncogene* 22:2984-92). El ARNm de HYA22 estaba elevado en las líneas celulares más resistentes a cisplatino comparadas con las líneas celulares más sensibles (figura 31).

Vinexina β : También conocida como SCAM-1, este gen codifica una proteína adaptadora que pertenece a la familia de proteínas que también incluyen vinexin β , CAP/ponsina y ArgBP2 (Kioka *et al.*, 2002, *Cell Structure and Function* 27:1-7). En el estado de la técnica no se sabía que la vinexina estaba relacionada con el cáncer de ovario. El ARNm de vinexina β estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes (figura 32).

G-CSFR: El receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSFR) se expresa casi universalmente en cáncer primario de ovario. Sin embargo, la expresión de su ligando, G-CSF, se encontró en las mismas células en solo la mitad de los casos estudiados, lo que sugiere la presencia de un bucle autocrino (Savarese *et al.*, 2001, *Cancer Letters* 162:105-15). En otro tercio de los casos estudiados G-CSF se encontró exclusivamente en el estroma, lo que sugiere que puede estar presente un sistema paracrino, en el que las células mesenquimatosas pueden proporcionar el ligando a las células cancerosas que expresan el receptor (Savarese *et al.*, 2001, *Cancer*

Letters 162:105-15). Una evaluación preliminar, retrospectiva sugirió que la supervivencia global es peor en pacientes que expresan el bucle paracrino solo comparadas con pacientes cuyo cáncer de ovario expresaba un eje autocrino (Savarese *et al.*, 2001, *Cancer Letters* 162:105-15). G-CSF y su receptor también se pueden coexpresar en ovarios normales y algunas neoplasias benignas de ovario. El ARNm de G-CSFR estaba elevado en líneas celulares quimiorresistentes (figura 33).

SRB1: También conocido como CLA-1, este gen codifica un receptor que reconoce tanto liposomas negativamente cargados como células apoptóticas. Se ha descrito que las células tumorales participan en la captación y eliminación de células y cuerpos apoptóticos (Fukasawa *et al.*, 1996, *Exp. Cell Res.* 222:246-50). La significancia biológica de estas observaciones se comprende mal. No ha habido divulgación anterior de conexiones entre la expresión de SRB1 y cáncer de ovario. El ARNm de SBR1 estaba elevado en las líneas celulares quimiorresistentes (figura 34).

IGFBP-7: Un miembro más recientemente identificado de las proteínas de unión a IGF, esta proteína se une a IGF-I e IGF-II con una afinidad relativamente baja (Oh, 1998, *Breast Cancer Res. Treat.* 47:283-93). El ARNm de IGFBP-7 estaba elevado en las líneas celulares quimiorresistentes (figura 35).

RAB22A pertenece a la subfamilia RAB de proteínas Ras (Kauppi *et al.*, 2002, *J. Cell Science* 115:899-911). El ARNm de RAB22A estaba disminuido en las líneas celulares quimiorresistentes y estaba elevado en las líneas celulares más sensibles a cisplatino (figura 36).

KIAA0082: KIAA0082 es un gen de longitud completa para el que no hay información publicada. La expresión del ARNm para este gen estaba elevada en las líneas celulares resistentes a cisplatino (figura 37).

NCOR2: Esta es una proteína correpresora muy relacionada con SMRT con un dominio de interacción específico para el receptor de la hormona tiroidea (Jepsen y Rosenfeld, 2002, *J Cell Science* 115:689-98). La expresión del ARNm para este gen estaba reducida en las líneas celulares quimiorresistentes comparadas con las líneas celulares sensibles a cisplatino (figura 38).

MT1: El papel fisiológico preciso de la metalotioneína 1L (MT1) se desconoce, sin embargo, estudios previos han descrito que los niveles de MT están elevados en células de carcinoma de ovario humano resistente a cisplatino (Andrews y Howell, 1990, *Cancer Cells* 2:35-43) y las células transfectadas con el gen MT se vuelven resistentes a cisplatino (Nakano *et al.*, 2003, *Anticancer Res.* 23:299-304). Se piensa que las MT funcionan secuestrando cisplatino en el citoplasma, aumentando de esta manera la capacidad de las células de resistir al fármaco (Nakano *et al.*, 2003, *Anticancer Res.* 23:299-304). Paradójicamente, el nivel del ARNm de MT1 parecía estar muy elevado en las células más sensibles a cisplatino (Hey) (figura 51).

MPP10: La fosfoproteína de la fase M (MPP10) es una proteína principalmente citoplásmica pero se puede secretar y es un componente de la ribonucleoproteína nucleolar pequeña U3 humana. La mayor parte de esta proteína colocaliza con fibrilarina (Baserga *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 36:64-7), y está implicada en el procesamiento del ARNr. No se ha descrito asociación para este gen o su producto con cáncer de ovario. Los niveles de expresión de MPP10 aumentaron al aumentar la sensibilidad a cisplatino (figura 52).

Ejemplo 3

Ensayo in vitro de SPARC como diana terapéutica

SPARC se expresaba a los niveles más altos en la línea celular más resistente a cisplatino (OVCA 429) comparada con las otras líneas celulares probadas (figura 4). En la técnica se sabe que esta proteína es una glicoproteína de unión a calcio que modula la adhesión y puede desempeñar un papel importante en la remodelación de tejidos y angiogénesis que fomenta el progreso del tumor y la invasividad (Ledda *et al.*, 1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:210-214).

La expresión de SPARC se probó en muestras de líquido ascítico humano obtenido de un individuo antes de cirugía citorreductora y posteriormente 9 meses después de la cirugía cuando el tumor del paciente había reaparecido (figura 5; los dos transcritos observados para SPARC surgen debido a poliadenilación diferencial; Ledda *et al.*, 1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:210-214). Los niveles de expresión de SPARC después de la cirugía estaban muy aumentados y se correlacionaban con un mal desenlace para este paciente. Esta observación también era consistente con descubrimientos hechos por otros grupos que estudiaban otras formas de cánceres sólidos (Golembieski *et al.*, 1999, *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:463-72; Briggs *et al.*, 2002, *Oncogene* 21:707-7-91; Huang y Wang, 2001, *TRENDS in Molecular Medicine* 7:355; Lollike *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:17762-9), lo que indica que la expresión de SPARC aumentada puede ser predictiva de éxito del tratamiento quimioterapéutico y evolución de la enfermedad en otros tipos de cáncer sólido además de cáncer de ovario.

Para probar si disminuir los niveles de expresión de la proteína SPARC en OVCA 429, la línea celular de cáncer de ovario más resistente, reduciría su capacidad de resistir a cisplatino, se diseñaron tres ARNip dirigidos contra diferentes regiones del mensaje de SPARC. Los ARNip de SPARC usados fueron:

Secuencia diana #1: AATCC TGT CCA GGT GGA AGT A (SEQ ID NO: 1);

Secuencia diana #2: AAGCT CCA CCT GGA CTA CAT C (SEQ ID NO: 2);

y

5 Secuencia diana #3: AATGA CAA GTA CAT CGC CCT G (SEQ ID NO: 3).

Los experimentos con ARNip descritos en el presente documento se realizaron usando el protocolo de lípido siPORT (Ambion). Las células se sembraron 24 horas antes de la transfección en medio MEM α que contenía SBF al 10%, de modo que las células estuvieran al 30-70% de confluencia en el momento en que se realizó el experimento. Se prepararon los complejos de siPORT y ARNip usando medio sin SBF o antibióticos. Para siPORT, se añadieron al medio 4 microlitros por pocillo para placas de seis pocillos y 0,5 microlitros para placas de 96 pocillos, se mezclaron con el vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 25 minutos. Para los ARNip, se usó una concentración de ARNip de 1-25 nM (normalmente se usa 12,5 nM), diluido en medio. Se añadió siPORT a la mezcla de ARNip, se mezcló suavemente, y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de lavar las células con medio sin suero, las células se añadieron a las placas (donde se usaron placas de 96 pocillos, las células se sembraron a una densidad de $4,5 \times 10^4$; donde se usaron placas de 6 pocillos, las células se sembraron a una densidad de $1-5 \times 10^5$). Se añadió el complejo siPORT/ARNip a cada placa/pocillo y las placas se balancearon suavemente para distribuir el complejo sobre la superficie de células. Después de incubación durante 4 horas en condiciones normales de cultivo, se añadió medio adicional que contenía SBF al 10% a las células. Después de 48 horas, se extrajo el ARN total.

Las células se transfectaron con las construcciones de ARNip siguiendo las instrucciones del suministrador (Ambion). Para placas de 6 pocillos, se usó ARNip 12,5 nM/pocillo para la transfección. Las lecturas de la DO_{260} de los ARNip se realizaron en duplicado a una dilución 1:100. Se hizo la media de las lecturas, después se multiplicó por el factor de dilución y después se multiplicó por 40 (la DO_{260} de 1 es igual a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN) para conseguir la concentración final de ARNip en $\mu\text{g/ml}$. El número se dividió por 14 (el número de μg de ARN en 1 mmol de un ARNbc 21mero medio) para obtener la concentración final del ARNip en μM , y después convertida de modo que la concentración se presentó en nM.

Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 48. Los tres ARNip disminuyeron el nivel del ARNm de SPARC en estas células. Las células tratadas solo con siPORT o solo con la hebra sentido del ARNip #2 no mostraron ninguna reducción significativa en la expresión del ARNm de SPARC. Sin embargo, un tratamiento de combinación, que incluía los tres ARNip juntos, si tuvo algún efecto (figura 48).

También se investigó la capacidad de las células OVCA 429 de resistir cisplatino en presencia de los ARNip de SPARC. Las células se trataron con siPORT solo o se transfectaron con la hebra sentido del ARNip #2 solo o el ARNip #2 completo. Las células se dejaron recuperar durante 48 horas después de la transfección y después se trataron con concentraciones crecientes de cisplatino o las correspondientes concentraciones de DMSO como control. Las células se expusieron al fármaco durante 24 horas después de lo cual el fármaco se eliminó y las células se dejaron recuperar durante 72 horas adicionales. El efecto de este tratamiento sobre la viabilidad celular se ensayó después mediante un ensayo de MTT. Los resultados se muestran en la figura 49; la figura 50 muestra estos resultados después de cuantificar los efectos sobre las células. Los datos sugerían que el tratamiento de las células con el ARNip #2 completo antes de la exposición a cisplatino reducía su nivel de resistencia a la mitad ($CI_{50} \sim 25-50 \mu\text{M}$ para los controles tratados con siPORT solo o la hebra sentido solo hasta una $CI_{50} \sim 12,5 \mu\text{M}$ después del tratamiento con el ARNip #2).

Los resultados de estos experimentos indicaban que SPARC es una diana terapéutica y marcador para cáncer de ovario.

50 Ejemplo 4

Prueba in vitro de MetAP2/p67 como diana terapéutica

MetAP2/p67 es una proteína bifuncional siendo ambas funciones importantes para el crecimiento celular (Li y Chang, 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**:152-9; Wu *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* **268**:10796-10801). En un papel, la proteína se une al factor de iniciación eucariota 2 (eIF-2) e inhibe su fosforilación, y en el otro papel su dominio C-terminal tiene actividad enzimática que cataliza la hidrólisis de las metioninas N-terminales de un número de proteínas celulares (Wu *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* **268**:10796-10801). La fosforilación de eIF-2 altera su repertorio de traducción lo que permite que diferentes mensajes se traduzcan a diferentes estados de fosforilación. Además, la actividad metionina aminopeptidasa es importante generalmente para la función de la proteína y el fallo en eliminar las metioninas N-terminales con frecuencia produce proteínas inactivas (Li y Chang, 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**:152-9).

La fumagilina, de *Aspergillus fumigatus*, y su análogo sintético TNP-470, se une covalentemente a e inhibe la actividad metionina aminopeptidasa de MetAP-2 pero no la de la muy relacionada MetAP-1 (Griffith *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:15183-8). También es importante notar que el tratamiento de varios tipos diferentes de

células con fumagilina produce expresión aumentada de MetAP-2 (Wang *et al.*, 2000, *J. Cell. Biochem.* 77:465-73); se piensa que la célula se adapta a una pérdida de función de MetAP-2 aumentando su nivel de expresión.

Los experimentos descritos en el presente documento sugerían que OVCA 429 expresaba aproximadamente 7 veces más MetAP-2 que la línea celular más sensible a cisplatino, Hey (figura 8). El análisis por transferencia Northern también confirmó que los niveles de expresión de MetAP-2 también estaban elevados en pacientes que eran clínicamente más resistentes a quimioterapia basada en cisplatino. La figura 9 muestra que el nivel del ARNm de MetAP-2 era aproximadamente 3 veces mayor en la paciente más resistente (CAP3) que en la paciente menos resistente (CAP1). Una paciente con un nivel intermedio de resistencia a quimioterapia basada en cisplatino también mostraba un nivel intermedio del ARNm de MetAP-2.

Se realizaron ensayos basados en MTT en los que se trataron células OVCA 429 con fumagilina sola, cisplatino solo y con combinaciones de diferentes concentraciones de cisplatino y fumagilina durante 4, 8 y 24 horas. Los resultados se muestran en las figuras 40, 41 y 42. La figura 40 (panel superior) muestra los efectos de aumentar la concentración de fumagilina en la supervivencia de células OVCA 429. Se observó algo de muerte celular pero hasta el 80% de las células sobrevivieron incluso a concentraciones muy altas de fumagilina. El tratamiento de las células con cisplatino solo (panel inferior) produjo una CI_{50} de aproximadamente cisplatino 100 μ M. La presencia de fumagilina 0,1 μ g/ml además de niveles crecientes de cisplatino redujo la CI_{50} hasta aproximadamente 50 μ M. Sin embargo, el tratamiento de las células con cisplatino en presencia de fumagilina 10 μ g/ml produjo supervivencia celular aumentada y una CI_{50} de aproximadamente 200 μ M.

Independientemente de la duración del tiempo de incubación, hubo un aumento del efecto de cisplatino en presencia de fumagilina 0,1 μ g/ml pero el efecto opuesto cuando las células se trataron con cisplatino en presencia de fumagilina 10 μ g/ml (figuras 41 y 42). Estas observaciones sugerían que a niveles bajos de fumagilina, se alcanza un equilibrio favorable y el fármaco actúa sinérgicamente con cisplatino, lo que produce la muerte de más células.

Se diseñaron tres ARNip contra diferentes regiones del mensaje de MetAP-2 (figura 43), para determinar el efecto de inhibir la expresión de MetAP-2. Los ARNip de MetAP-2 eran:

Secuencia diana #1: AAAGA TCA GCA TTG GAA GAT A (SEQ ID NO: 4)
Secuencia diana #2: AAGCA CAT CGA CAA GTT AGA A (SEQ ID NO: 5)
Secuencia diana #3: AAACA GTG CCG ATT GTG AAA G (SEQ ID NO: 6)

La figura 44 muestra el efecto del ARNip #1 en los niveles de expresión de MetAP-2 en OVCA 429. Se transfectaron células control con la hebra sentido del mismo ARNip sola o se trataron con el agente de transfección (lípidos siPORT). La transfección de las células con el ARNip #1 redujo los niveles de expresión de MetAP-2 a la mitad, incluso aunque la eficacia de transfección no fue el 100%. Se observó poco efecto en los niveles de expresión de GAPDH en esas células, lo que indica que la expresión génica no estaba en general afectada por este tratamiento. Además, el tratamiento de las células con los ARNip #2 y #3 no produjo una reducción en la expresión de MetAP-2.

Se probó la capacidad de OVCA 429 de resistir cisplatino cuando la expresión de MetAP-2 se bloqueaba tratando las células con el ARNip #1, la hebra sentido #1 sola o el lípido siPORT solo. Después de 48 horas de incubación con el ARNip las células se expusieron a concentraciones variables de cisplatino o las concentraciones correspondientes de su solvente, DMSO, durante 24 horas. Los resultados de este experimento se cuantificaron y se muestran en la figura 45. Los resultados indicaban que la presencia del ARNip #1 redujo la CI_{50} de OVCA 429 de 25 μ M hasta aproximadamente 3 μ M. La figura 46 muestra una fotografía de las placas de 96 pocillos después de realizar el ensayo de MTT.

En conjunto los resultados indicaban que MetAP-2 es una diana útil para la intervención terapéutica en cáncer de ovario.

Ejemplo 5

Prueba *in vitro* de calpaína 2 y S100A10 como dianas terapéuticas y reducción de la expresión de S100A11 en células OVA 429

549728 (calpaína 2)

Se diseñaron tres ARNip contra diferentes regiones del mensaje de calpaína 2 usando los métodos descritos anteriormente. Los ARNip de calpaína 2 eran:

#1 AA GGC ATA CGC CAA GAT CAA C (SEQ ID NO: 7);
#2 AA ACT TCT TCC TGA CGA ATC G (SEQ ID NO: 8); y
#3 AA ACG CTA TTC AAG ATA TTT A (SEQ ID NO: 9).

Cada ARNip se introdujo en células OVCA 429 como se ha descrito anteriormente. La figura 53 muestra los resultados de los experimentos de silenciamiento en las células OVCA 429 usando estas secuencias. Las secuencias #1 y #3 disminuyeron los niveles de expresión génica en aproximadamente el 50% usando el protocolo descrito anteriormente. Además, las células OVCA 429 que comprendían el ARNip #3 se trataron con varias concentraciones de cisplatino. Habitualmente, la CI_{50} de células OVCA 429 es aproximadamente cisplatino 25 μM después de 24 horas de exposición al fármaco. Como se muestra en la figura 54, el ARNip #3 de calpaína 2 redujo la CI_{50} a 3,12 μM , aumentando por ello la sensibilidad de las células a cisplatino en varias veces. Además, las células OVCA 429 se trataron con concentraciones crecientes del inhibidor de calpaína I (ALLN) en presencia o ausencia de cisplatino. Como se muestra en la figura 55, ALLN redujo la CI_{50} de estas células en presencia de cisplatino a 12,5 μM . Por tanto, el ARNip #3 de calpaína 2 tuvo un mayor efecto que ALLN en la sensibilidad de las células OVCA 429 a cisplatino.

756595 (S100A10)

Se generaron tres ARNip contra el mensaje de S100A10:

#1 AA ATG GAA CAC GCC ATG GAA A (SEQ ID NO: 59);
 #2 AA ATT CGC TGG GGA TAA AGG C (SEQ ID NO: 60); y
 #3 AA TAA TGA AGG ACC TGG ACC A (SEQ ID NO: 61).

Como se muestra en la figura 56, el ARNip #3 redujo la CI_{50} de las células OVCA 429 desde cisplatino 25 μM a 6,25 μM , aumentando por ello la sensibilidad de las células a cisplatino.

810612 (S100A11)

Se diseñaron tres ARNip contra el mensaje de S100A11 usando los métodos descritos anteriormente. Los ARNip de S100A11 eran:

#1 AA AGG ATG GTT ATA ACT ACA C (SEQ ID NO: 10);
 #2 AA GAA ACT GGA CAC CAA CAG T (SEQ ID NO: 11); y
 #3 AA TCT GAT TGG TGG CCT AGC T (SEQ ID NO: 12).

Cada ARNip se introdujo en células OVCA 429 como se ha descrito anteriormente. La figura 57 muestra que los ARNip #1 y #2 disminuyeron los niveles de expresión génica en las células OVCA 429 en aproximadamente el 50% y el 25%, respectivamente, usando los métodos descritos anteriormente.

Ejemplo 6

Expresión de MetAP-2, SPARC, calpaína 2, S100A10 y S100A11 en cáncer de colon

Se obtuvieron conjuntos emparejados de ADNc de colon comercialmente disponibles de BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA) que se aislaron de cinco individuos obtenidos de tejido no tumoral y también de tejido tumoral adyacente.

Se realizaron experimentos de PCR en tiempo real cuantitativa para determinar los niveles de expresión de MetAP-2, SPARC, S100A10, S100A11 y calpaína-2 en los tejidos de colon normal y tumoral. La figura 58 muestra los niveles de expresión de MetAP-2 en 5 pares de ADNc de colon emparejados. Los datos indican que dos de los pacientes tenían niveles de expresión muy elevados en ADNc tumoral comparado a sus ADNc no tumoral emparejado (pacientes B y C; figura 58). Otro paciente mostró expresión solo ligeramente elevada en el ADNc tumoral comparado con su ADNc no tumoral emparejado (paciente A, figura 58). El nivel de expresión en OVCA 429 se usó como referencia. Artículos previos han mostrado que la metástasis hepática del cáncer de colon humano se puede prevenir mediante el inhibidor de MetAP-2 TNP-470 (Tanaka *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:836-9).

La figura 59 muestra que los niveles de expresión del ARNm de SPARC estaban elevados en 4 de 5 muestras tumorales emparejadas comparadas con sus ADNc no tumorales emparejados. La figura 60 muestra que los niveles de expresión del ARNm de S100A11 estaban elevados en todas las muestras tumorales emparejadas comparadas con sus ADNc no tumorales emparejados. La figura 61 muestra que los niveles de expresión del ARNm de S100A10 estaban elevados en 4 de 5 muestras tumorales emparejadas comparadas con sus ADNc no tumorales emparejados. La figura 62 muestra que los niveles de expresión del ARNm de calpaína-2 estaban elevados en todas las muestras tumorales emparejadas comparadas con sus ADNc no tumorales emparejados.

En conjunto estas observaciones sugieren que MetAP-2, así como SPARC, S100A11, S100A10 y calpaína-2, son dianas terapéuticas para pacientes de cáncer de colon.

Ejemplo 7

ELISA sándwich para detectar proteínas secretadas en suero

Se recubren los pocillos de una placa de 96 pocillos con anticuerpos generados contra un producto génico de interés. Se diluyen en serie alícuotas del producto génico diana recombinante purificado y se usan para generar una curva patrón para la cuantificación. Se añaden entonces alícuotas de sueros de pacientes a cada pocillo. La placa se cubre para minimizar la evaporación y se incuba a 4°C durante unas pocas horas a toda la noche. El antígeno se elimina y los pocillos se lavan 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añaden a cada pocillo 300 µl de solución de bloqueo (solución de gel de pescado al 3% en PBS) y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se elimina y los pocillos se lavan 3 veces con PBS. Se añade después a cada pocillo el anticuerpo apropiado conjugado a peroxidasa de rábano (100 µl por pocillo) y se incuba a temperatura ambiente durante 1-2 horas. El anticuerpo se elimina entonces y los pocillos se lavan 3 veces con solución de NP-40 (NP40 al 0,05% v/v en PBS). Se detecta la unión añadiendo ABTS (Rockland Immunochemicals) a cada pocillo (a 100 µl por pocillo) durante 30 minutos a temperatura ambiente y leyendo la absorbancia a 405 nm usando un lector de microplacas. Si se usan conjugados de fosfatasa alcalina en lugar de peroxidasa, se usa pNPP (Rockland Immunochemicals) en lugar de ABTS para detectar la unión.

Una vez determinado el límite de detección de las curvas patrón generadas usando las proteínas purificadas, se prueban un número de sujetos que no tienen cáncer y un número de pacientes a los que se ha diagnosticado que tienen cáncer o afecciones benignas para determinar un intervalo esperado de concentraciones para el producto génico particular de interés. El intervalo esperado para pacientes con cáncer define el límite que se puede usar para identificar o distinguir una paciente con cáncer de ovario o una paciente con enfermedad recurrente de una paciente que responde o un sujeto sano sin cáncer.

Ejemplo 8

“Silenciamiento” mediado por ARNip de la expresión génica

Se probó la capacidad de ARNip específicos para varios genes de reducir (o “silenciar”) sus genes respectivos en líneas celulares de cáncer de ovario siguiendo los protocolos descritos anteriormente. En cada caso, se probaron varios ARNip frente a un ARNip control (no específico) que coincidía en contenido en GC (de Dharmacon, Inc., Lafayette, CO) para probar los ARNip. En algunos casos también se incluyó un control negativo (sin tratamiento). El nivel de silenciamiento de la expresión varió con los diferentes ARNip. Los genes específicos y las secuencias de ARNip para cada gen específico se describen a continuación:

1. Se generaron dos ARNip para SAPK/Erk1 (L36870):

L36870 (726147)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 64): AAA TGG GAC GAG GAG CTT ATG (empieza en el pb 320 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 65): AAG CGC ATC ACG ACA AGG ATA (empieza en el pb 831 en la secuencia codificante).

Ambas secuencias tuvieron éxito en reducir la expresión de SAPK, dando la secuencia #2 una reducción del 60% en el nivel del ARNm.

2. Se generaron tres ARNip para eEF1ε (BC005291):

BC005291 (306921)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 66): AAC AGG ATT GAC TAC TAT AGC (empieza en el pb 123 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 67): AAT ACA GGG TCA CTC AAG TAG (empieza en el pb 227 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 68): AAA TAT CTT AAT GTG TCT CGC (empieza en el pb 412 en la secuencia codificante)

Las secuencias diana # 1 y 2 tuvieron éxito en reducir la expresión de eEF1ε dando la secuencia #1 un 65% de reducción en nivel del ARNm.

3. Se generaron tres ARNip para G-CSFR (M59818).

M59818 (809639)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 69): AAG TGT GAG CTG CGC CAC AAG (empieza en el pb 793 en la secuencia codificante).

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 70): AAG AGC CCC CTT ACC CAC TAC (empieza en el pb 1666 en la secuencia codificante).

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 71): AAC AGG AAG AAT CCC CTC TGG (empieza en el pb 1957 en la secuencia codificante).

Las secuencias diana # 1 y 3 redujeron el nivel de expresión de G-CSFR, con la secuencia #1 una reducción del 53% en el nivel del ARNm.

4. Se generaron tres ARNip para ARA9/XAP2 (U31913):

U31913 (814731)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 72): AAA CGT GTG ATA CAG GAA GGC (empieza en el pb 48 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 73): AAC AAG TAC GAC GAC AAC GTC (empieza en el pb 775 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 74): AAC GTC AAG GCC TAC TTC AAG (empieza en el pb 790 en la secuencia codificante).

Las secuencias diana # 2 y 3 produjeron una expresión reducida de ARA9, dando la secuencia #3 una reducción del 50% en el nivel del ARNm.

5. Se generaron tres ARNip para RNPS1 (AF015608):

AF015608 (897594)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 75): AAT ATT CAT ACG GCA TGG ACT (empieza en el pb 327 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 76): AAC CTA AAA TAG AAG ACC CCT (empieza en el pb 680 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 77): AAA AGA TGC TGA CTC AGA AAA (empieza en el pb 752 en la secuencia codificante).

Las tres secuencias tuvieron éxito en reducir la expresión de RNPS1, dando la secuencia #1 una reducción del 35% en el nivel del ARNm.

6. Se generaron tres ARNip para dedos fusionados (BC001134):

BC001134 (321247)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 78): AAC CTA AAA TAG AAG ACC CCT (empieza en el pb 680 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 79): AAG ACC CCT ATG CAA TTA GCT (empieza en el pb 692 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 80): AAA AAG CCT GAA GAA CAG CAC (empieza en el pb 769 en la secuencia codificante).

Las tres secuencias tuvieron éxito en reducir la expresión de dedos fusionados, dando la secuencia #2 una reducción del 43% en el nivel del ARNm.

7. Se generaron tres ARNip para grancalcina (BC005214):

BC005214 (34140)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 81): AAA TGG GAT TTA ATG CAT TCA (empieza en el pb 323 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 82): AAC TTC ATG ACT GTT GAT CAA (empieza en el pb 379 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 83): AAC ATC ATG AGT TGC GTC AAG (empieza en el pb 419 en la secuencia codificante).

Las tres secuencias tuvieron éxito en reducir la expresión de grancalcina, dando la secuencia #2 una reducción del 83% en el nivel del ARNm.

8. Se generaron tres ARNip para SRB1/CLA1/CD3611 (BC022087):

BC022087 (756687)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 84): AAG CAG CAG GTC CTT AAG AAC (empieza en el pb 109 en la secuencia codificante)

5 Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 85): AAT CTC ATC AAC AAG TAC TTT (empieza en el pb 565 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 86): AAT TCA GAA CGT CAG CAC CTG (empieza en el pb 981 en la secuencia codificante).

10 Las secuencias diana # 1 y 3 tuvieron éxito en reducir la expresión de SRB1, dando la secuencia #1 una reducción del 60% en el nivel de ARNm.

9. Se generaron tres ARNip para KIAA0082 (BC031890):

15 BC031890 (825293)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 87): AAG AGG AGA ACT GAC CCA GAA (empieza en el pb 4 en la secuencia codificante)

20 Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 88): AAA TGA GCG ATT GGA TGG TGG (empieza en el pb 509 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 89): AAG ATC ATC AAG GGC TCC AGT (empieza en el pb 2164 en la secuencia codificante).

25 La secuencia #1 dio una reducción del 65% en el nivel del ARNm. Las secuencia #2 y #3 no tuvieron efecto sobre el nivel del ARNm.

10. Se generaron tres ARNip para eIF2Bε (BC013590):

BC013590 (1630998)

30 Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 90): AAT GTG GTT CGA ATA ATT ACA (empieza en el pb 352 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 91): AAA CTC GAG ATG ACT TTG TGC (empieza en el pb 800 en la secuencia codificante)

35 Secuencia diana #3 (SEQ ED NO: 92): AAT CAA CAG CTG CAG AGG TTC (empieza en el pb 2098 en la secuencia codificante).

La secuencia #1 dio una reducción del 57% en el nivel del ARNm, la secuencia #2 dio una reducción del 54% en el nivel de ARNm y la secuencia #3 dio una reducción del 43% en el nivel del ARNm.

40 11. Se generaron tres ARNip para calponina 2 (D83735):

D83735 (713886)

45 Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 93): AAG GAT GGA ACT ATC TTA TGC (empieza en el pb 163 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 94): AAT TTC GAC GAT GCC ACC ATG (empieza en el pb 457 en la secuencia codificante)

50 Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 95): AAC CGA CAA GTG TGA CAA CTC (empieza en el pb 708 en la secuencia codificante).

Las tres secuencias redujeron el nivel de expresión génica, dando la secuencia #3 una reducción del 75% en el nivel del ARNm.

55 12. Se generaron tres ARNip para HYA22 (D88153):

D88153 (123980)

60 Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 96): AAA GAA ATG TGT GGT CAT TGA (empieza en el pb 507 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 97): AAA TCG ATG GAA CTA TAC ATC (empieza en el pb 596 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 98): AAC TAT ACA TCA GGT GTA TGT (empieza en el pb 606 en la secuencia codificante).

65

Las tres secuencias redujeron el nivel de expresión génica, dando la secuencia #3 una reducción del 60% en el nivel del ARNm.

13. Se generaron tres ARNip para CA 125 (BC009808):

BC009808 (CA 125)

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 99): AAT GGT TTC ACC CAT CAG AGC (empieza en el pb 235 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 100): AAG GGC TCA GCT ACA TTC AAC (empieza en el pb 2203 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 101): AAT ACA ACG TCC AGC AAC AGT (empieza en el pb 3380 en la secuencia codificante).

La secuencia #3 dio una reducción del 50% en el nivel del ARNm.

14. Se generaron dos ARNip para HMT1 (AF222689) y se probaron en células Hey:

AF222689

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 102): AAC TCC ATG TTT CAT AAAC CGG (empieza en el pb 202 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 103): AAC GTG TAT GGC TTC GAC ATG (empieza en el pb 619 en la secuencia codificante).

Ambas secuencias tuvieron éxito en reducir la expresión del ARNm de HTM1 dando la secuencia #1 aproximadamente una reducción del 70% y la secuencia #2 justo por encima del 60% de reducción.

15. Se generaron tres ARNip para MPP10 (X98494) y se probaron en células Hey:

X98494

Secuencia diana #1 (SEQ ID NO: 104): AAG TTC CAG AAA TCT GAA ATA (empieza en el pb 357 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #2 (SEQ ID NO: 105): AAG AAA ATC CAG AAC ATG TAG (empieza en el pb 1043 en la secuencia codificante)

Secuencia diana #3 (SEQ ID NO: 106): AAA ACA GTA GCT TCG GAG AAG empieza en el pb 1414 en la secuencia codificante)

Las tres secuencias dieron una reducción en la expresión del ARNm dando la secuencia #1 casi un 90% de reducción, y las secuencias #2 y #3 con aproximadamente el 30% y el 40% de reducción, respectivamente.

16. Se generaron dos ARNip para IGFBP-7 (BC017201) y se probaron en OVCA 429.

BC017201

Secuencia diana #1: AAG GTA AAA AGG GGT CAC TAT (empieza en el pb 583 en la secuencia codificante). (SEQ ID NO. 107)

Secuencia diana #2: AAA GGG GTC ACT ATG GAG TIC (empieza en el pb 590 en la secuencia codificante). (SEQ ID NO. 108)

Solo la secuencia #1 dio una reducción en los niveles de ARNm que fue aproximadamente el 60% comparada con el control.

17. Se generó un ARNip para NM23-D (BC004880) y se probó en células OVCA 429:

BC004880 (203003)

Secuencia diana #3 AAT GTC ATC CAC GCC AGC GAC (empezando en el pb 442 desde el 1^{er} ATG) (SEQ ID NO 135)

Solo la secuencia diana #3 redujo los niveles de ARNm en aproximadamente el 50% comparado con el control.

18. Se generaron tres ARNip para WDR1 (AB010427) y se probaron en células OVCA 429:

AB010427

Secuencia diana #1: AAT GGA AAG TGC GTC ATC CTA (empezando en el pb 106 desde el 1^{er} ATG) (SEQ ID NO 136)

Secuencia diana #2 AAG TTC ACA ATT GGC GAC CAC (empezando en el pb 544 desde el 1^{er} ATG) (SEQ ID NO 137)

Secuencia diana #3: AAG TGC TTC AGC ATC GAC AAC (empezando en el pb 1309 desde el 1^{er} ATG) (SEQ ID NO 138)

Todas las secuencias diana redujeron los niveles del ARNm, la #1 en aproximadamente el 85%, la #2 en aproximadamente el 75% y la #3 en aproximadamente el 70% comparadas con el control.

19. Se generó un ARNip para vinexina E (AF037261) y se probó en células OVCA 429:

AF037261

Secuencia diana #2: AAG AGT TAC CTA GAA GCA CCT (SEQ ID NO 139)

Las secuencias diana #1 y #3 no redujeron los niveles del ARNm comparadas con el control mientras que la #2 redujo el ARNm en aproximadamente el 50% comparado con el control.

20. Se generaron tres ARNip para KLK6 (BC015525) y se probaron en células OVCA 429:

BC015525

Secuencia diana #1: AAA AAA CCG AAT CTT CAG GTC (SEQ ID NO 140)

Secuencia diana #2: AAA CTC TCT GAA CTC ATC CAG (SEQ ID NO 141)

Secuencia diana #3: AAC TGG ATC CAA AAA ACC ATT (SEQ ID NO 142)

La secuencia diana #1 no redujo los niveles del ARNm comparada con el control mientras que la #2 redujo el ARNm en aproximadamente el 42% y la #3 en aproximadamente el 55% comparadas con el control.

21. Se generó un ARNip para eIF5 (U49436) y se probó en células OVCA 429:

U49436

Secuencia diana #1 Secuencia diana del ARNm: AAT GAG CGT TAC ATT GTC AAT (SEQ ID NO 143)

Las secuencias diana #2 y #3 no redujeron los niveles del ARNm comparadas con el control mientras que la #1 redujo el ARNm en aproximadamente el 59% comparada con el control.

22. Se generó un ARNip para la proteína de dedo de zinc 262/MYM (AB007885) y se probó en células OVCA 429:

AB007885

Secuencia diana #3: AAA ATA TGG GAA CCT ACA ATA (empezando en el pb 3058 desde el 1^{er} ATG) (SEQ ID NO 144)

Las secuencias diana #1 y #2 no redujeron los niveles del ARNm comparadas con el control mientras que la #3 redujo el ARNm en aproximadamente el 45% comparada con el control.

Ejemplo 9

Ensayo funcional *in vitro* de genes validados

Se examinó la capacidad de ARNip específicos para aumentar la sensibilidad de células OVCA 429 y OVCAR-3 a cisplatino sustancialmente como se ha divulgado anteriormente en los ejemplos 3-5 anteriores. En cada caso la sensibilidad a cisplatino aumentó en presencia de los ARNip específicos pero no del ARNip no específico (control) o el control negativo (sin tratamiento). Los datos indican que los genes probados pueden estar funcionalmente implicados en el desarrollo de la resistencia a cisplatino en las líneas celulares de cáncer de ovario. Los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Pruebas *in vitro* de sensibilidad a cisplatino

Número de acceso	Nombres	Secuencia de ARNip	Probado en células OVCA 429	429: sensibilidad aumentada a cisplatino	Probado en células OVCAR-3	OVCAR-3: sensibilidad aumentada a cisplatino
M59818	G-CSFR	#1	sí	sí		
U31913	ARA9 XAP 2	#3	sí	sí	sí	sí
AF015608	RNPS1	#1	sí	sí		
BC001134	Dedos fusionados	#2	sí	sí	sí	sí
BC005214	Grancalcina	#2	sí	sí	sí	sí
BC022087	SRB1	#1	sí	sí	sí	sí
BC031890	KIAA0082	#1	sí	sí	sí	sí
AB007885	Proteína con dedos de zinc	#3	sí	sí	sí	sí
BC004880	NM23D	#3	sí	sí	sí	sí
AB010427	WRD1	#1		no	sí	sí
U49436	eIF5 eIF5A	#1	sí	sí	sí	sí
D83735	Calponina 2	#3	sí	sí	sí	sí
BC015525	KLK6	#3	sí	sí	sí	sí
AF037261	Vinexina B	#2		no	sí	sí
BC017201	IGFBP-7	#1	sí	sí	sí	sí
D88153	<u>HYA22</u>	#3	sí	marginal	sí	sí
BC013590	<u>eIF2Bε</u>	#1	sí	sí	sí	sí
L36870	<u>SAPK/Erk1</u>	#2	sí	sí	sí	sí

5 Ejemplo 10

Experimentación *in vivo*

Se desarrolló el siguiente protocolo para examinar el crecimiento tumoral usando células OVCAR-3 y ratones desnudos: se inocularon células OVCAR-3 (15 millones/inyección) bajo la región superior del brazo de ratones desnudos. Aparecieron bultos visibles después de 25 días. Los tumores fueron medibles aproximadamente 35 días después de la inoculación y los animales se trataron con cisplatino a 4 µg/kg de peso corporal administrado mediante inyección IP 3 veces a la semana durante 2 semanas, seguido por una semana sin tratamiento, o se trataron con solución salina sola como control. La figura 63 muestra el volumen de los tumores como función del peso corporal de los dos ratones. Los datos demostraron que en el animal control que tiene el tumor, el tumor siguió creciendo en ausencia de quimioterapia (ratón #1). El animal que recibió tratamiento con cisplatino, por el contrario, mostró una estabilización del tamaño del tumor (ratón #2). También se muestra una fotografía de los tumores antes y después del tratamiento con cisplatino.

Este protocolo se repite usando líneas celulares estables que expresan los ARNip contra genes identificados en el presente documento (MetAP-2, SPARC, S100A10, S100A11 y calpaína-2). Se han desarrollado líneas de células OVCAR-3 estables que expresan ARNip de calpaína 2 o S100A11, así como una línea de células OVCAR-3 control que expresa ARNip estable contra la proteína fluorescente verde (GFP, una proteína marcadora irrelevante para el crecimiento celular); la expresión de calpaína 2 y S100A11 y los efectos de la expresión del ARNip medido mediante PCR en tiempo real cuantitativa se muestran en la figura 64. Se separan quince ratones en tres grupos de cinco. Un grupo se trata como control, se inyecta con células OVCAR-3 sin expresión de ARNip, el segundo grupo se inyecta con células OVCAR-3 que expresan ARNip y el tercer grupo se inyecta con células OVCAR-3 que expresan un ARNip específico de GFP. Después de sean aparentes tumores medibles, el grupo control recibe una inyección de solución salina, mientras que el segundo y el tercer grupo reciben el tratamiento estándar de cisplatino. El crecimiento tumoral se observa como función del peso corporal como se ha descrito anteriormente.

En otro experimento, quince ratones separados en grupos de cinco se inoculan con células OVCAR-3 sin adulterar (es decir, no recombinantes) y se deja que crezcan tumores. Un grupo se trata como control. Después de que sean aparentes tumores medibles, el grupo control recibe una inyección de solución salina, el segundo grupo recibe un tratamiento estándar de cisplatino como se ha descrito anteriormente y el tercer grupo recibe un tratamiento estándar con cisplatino combinado con TNP-470 (un derivado de fumagilina clínicamente reconocido). Se observa el crecimiento tumoral como función del peso corporal como se ha descrito anteriormente.

La información divulgada en los ejemplos se puede resumir como sigue:

Tabla 5

No. de acceso	Nombres	Probado en un panel de muestras de tejido de pacientes de cáncer de ovario	Validación funcional <i>in vitro</i> pasada en OVCA 429, OVCAR-3 (o ambas) o Hey*
BC015973	S100A10 p11 CLP11 cadena ligera de calpactina 1 42 C	sí	sí
BC001410	S100A11 S100C Calgizarina	sí	sí
AF261089	Calpaína 2 CANPL2 MCANP	sí	sí
BC004974	SPARC Osteonectina BM-40	sí	sí
BC013782	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	sí	sí
BC015525	KLK6 Zima Neurosina Proteasa M	sí	sí
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	sí	no
U31913	ARA9 XAP2	no	sí
D83735	Calponina 2	no	sí
U19251	NAIP	sí	no
BC005291	eEF1ε p18	sí	no
AF015608	RNPS1	sí	sí
U49436	eIF5 eIF5A	sí	sí
BC013590	eIF2Bε	sí	sí
M65217	HSF2 HSTF2	no	no
AB010427	WDR1 NORI-1	sí	sí
BC001134	dedos fusionados	no	sí
BC004880	NM23D mn23-H4	sí	sí
U10439	ADAR1	sí	no
BC005214	Grancalcina	no	sí
BC009808	NBR1	no	no
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	sí	sí
AB007885	Proteína de dedo de zinc-262 MYM	sí	sí
D88153	HYA22	sí	sí
AB049635	MRPL4 CGI-28	sí	no

No. de acceso	Nombres	Probado en un panel de muestras de tejido de pacientes de cáncer de ovario	Validación funcional <i>in vitro</i> pasada en OVCA 429, OVCAR-3 (o ambas) o Hey*
AF037261	Vinexina β	sí	sí
M59818	G-CSFR	sí	sí
BC015710	RAB22A	sí	no
BC017201	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	no	sí
BC011770	Quinasa FAST	no	no
AB057597	TESK2	no	no
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	sí	sí
BC031890	KIAA0082	no	sí
NM_006312	NCOR2	no	no
BC032338	MT1	sí	no
X98494	MPP10	no	no

* Todos los genes (KLK6, ARA9, calponina 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , WDR1, dedos fusionados, NM23D, grancalcina, SAPK/Erk1, proteína con dedos de zinc-262 MYM, HYA22, vinexina β , G-CSFR, IGFBP-7, SRB1 o KIAA0082) donde la expresión está elevada en células tumorales resistentes a fármacos se probaron en células OVCAR-3 u OVCA 429, y todos los genes (MPP10, HMT1, AIP, Eef1 ϵ , RAB22A, NCOR2 o MT1) donde la expresión está reducida en las células tumorales más resistentes se probaron en células Hey.

Lista de secuencias

10 <110> The Penn State Research Foundation
Al-Murrani, Samer

<120> Métodos para predecir y superar la resistencia a quimioterapia en cáncer de ovario y para predecir la aparición de cáncer de colon

15 <130> 03-303-B

<140> US

<141> 2004

20 <150> US 60/533.505
<151> 31-12-2003

<160> 144

25 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 21

30 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

aatcctgtcc aggtggaagt a

21

35 <210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

40 <400> 2

aagctccacc tggactacat c

21

45 <210> 3

<211> 21

<212> ADN

	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
5	aatgacaagt acatcgccct g	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
	aaagatcagc attggaagat a	21
	<210> 5	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
20	aagcacatcg acaagttaga a	21
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
	aaacagtgcc gattgtgaaa g	21
	<210> 7	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
35	aaggcatacg ccaagatcaa c	21
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
	aaacttcttc ctgacgaatc g	21
45	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 9	
	aaacgctatt caagatattt a	21
	<210> 10	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 10	
60	aaaggatggt tataactaca c	21
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 11 aagaaactgg acaccaacag t	21
5	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 12 aatctgattg gtggcctagc t	21
15	<210> 13 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Sonda de baliza molecular	
25	<220> <221> Inseguro <222> (1)...(1) <223> c unida a FAM	
30	<220> <221> Inseguro <222> (28)...(28) <223> g unida a DABCYL	
	<400> 13 cgcgtatgaa ctgggcttat gtgacgcg	28
35	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 14 ctgggctctg ccttaaacac	20
45	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador de PCR	
55	<400> 15 gctcccaaaa gtttgaacca	20
60	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 16	

	ttgcctgagg ctgtaactga	20
5	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR <400> 17 ccacttcttt gccacaaagt	20
15	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR <400> 18 gaattcgggtc agctcagagt	20
25	<210> 19 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Sonda de baliza molecular	
35	<220> <221> Inseguro <222> (1)...(1) <223> c unida a FAM	
40	<220> <221> Inseguro <222> (25)...(25) <223> g unida a DABCYL	
45	<400> 19 cgcttggtg ggtttgaagg aggcg	25
50	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador de PCR <400> 20 atcgagtcctc tgattgctgt	20
60	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	

	<400> 21 gcctgcatga ggtggttagt	20
5	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 22 cttgccatga ctccttcctc	20
15	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 23 gcagaagcac atcgacaagt	20
25	<210> 24 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 24 gcctgcattt aatccattct c	21
40	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
45	<400> 25 taaccacgtc ctgctgaagt	20
50	<210> 26 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
55	<400> 26 gctttaagaa agttcttatc aac	23
60	<210> 27 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	

	<223> Cebador de PCR	
	<400> 27 gcacagcgga gtggtaaga	19
5	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR	
15	<400> 28 cagaggagtc agacacattg	20
20	<210> 29 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
25	<400> 29 gtatacttac ttcagtgctg tt	22
30	<210> 30 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 30 cattcttgct ataacgttta aca	23
40	<210> 31 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 31 ctctgtgact tcggcatca	19
50	<210> 32 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador de PCR	
60	<400> 32 cagacatcag agcggacat	19
	<210> 33 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	

	<220> <223> Cebador de PCR	
5	<400> 33 aagaactggg ttcagtggaa a	21
	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
15	<400> 34 gagagtgcac ggtcttgagt	20
	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 35 agccaccagc taagtacctt	20
30	<210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 36 catcgatttc aaccggaaca a	21
40	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 37 gtgtgtggac ctccatgtta	20
50	<210> 38 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
55	<400> 38 agcacaccat tacagacaag t	21
60	<210> 39 <211> 20	

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> Cebador de PCR		
	<400> 39		
	ggaaccagtt tctgcaggaa	20	
10	<210> 40		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 40		
	ctccagcagc acctcaatg	19	
20	<210> 41		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
	<400> 41		
30	atccaagggtt atgtggtttc tt	22	
	<210> 42		
	<211> 19		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
40	<400> 42		
	cacctcctgg gcttctgaa	19	
	<210> 43		
	<211> 22		
45	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
50	<400> 43		
	gatccatgaa gctaattgtac aa	22	
	<210> 44		
55	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> Cebador de PCR		
	<400> 44		
	acgggcagaa gccttcggt	19	

5	<210> 45 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
10	<400> 45 cctgagggttc tccgagatg	19
15	<210> 46 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
20	<400> 46 tccagcccga aattctctgt	20
25	<210> 47 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 47 caagaggcgg aagggtaaa	19
35	<210> 48 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 48 cagccgctcg ggtagggt	17
45	<210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador de PCR	
55	<400> 49 cactatggaa ggaccttgct	20
60	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 50	

	ggatacaggt gtaggtaa c	21
	<210> 51	
	<211> 22	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
10	<400> 51	
	tcccagatta ggaatttatg ta	22
	<210> 52	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de PCR	
	<400> 52	
	cttctggaac aggcgaaga	19
25	<210> 53	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 53	
	gctggcccag acgacgaa	18
35	<210> 54	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 54	
45	gcagacacac gtggatggt	19
	<210> 55	
	<211> 22	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
55	<400> 55	
	gatgaagtta aatcctcctt tg	22
	<210> 56	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	

	<400> 56 cctcttctgt gctgtcactt	20
5	<210> 57 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 57 cctgcaagaa gagctgctg	19
15	<210> 58 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 58 cacagctgtc ctggcatca	19
25	<210> 59 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 59 aaatggaaca cgccatggaa a	21
35	<210> 60 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 60 aaattcgctg gggataaagg c	21
45	<210> 61 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 61 aataatgaag gacctggacc a	21
50	<210> 62 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 62 gctcccaaaa gtttgaacca	20
60	<210> 63 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65		

	<220>		
	<223> Cebador de PCR		
5	<400> 63 gcctgcatga ggtggtagt	20	
	<210> 64		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 64 aaatgggacg aggagcttat g	21	
15	<210> 65		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 65 aagcgcacga cgacaaggat a	21	
	<210> 66		
25	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 66 aacaggattg actactatag c	21	
30	<210> 67		
	<211> 21		
	<212> ADN		
35	<213> Homo sapiens		
	<400> 67 aatacagggt cactcaagta g	21	
40	<210> 68		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
45	<400> 68 aaatatctta atgtgtctcg c	21	
	<210> 69		
	<211> 21		
50	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 69 aagtgtgagc tgcgccacaa g	21	
55	<210> 70		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
60	<400> 70 aagagccccc ttaccacta c	21	
	<210> 71		
65	<211> 21		

	<212> ADN <213> Homo sapiens	
5	<400> 71 aacaggaaga atccccctctg g	21
10	<210> 72 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 72 aaacgtgtga tacaggaagg c	21
20	<210> 73 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 73 aacaagtacg acgacaacgt c	21
30	<210> 74 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 74 aacgtcaagg cctacttcaa g	21
40	<210> 75 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<220> <221> característica mezcla <222> (3)...(3) <223> n es a, c, g, o t	
50	<400> 75 sdnaatattc atacggcatg gact	24
55	<210> 76 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 76 aacctaaaat agaagacccc t	21
65	<210> 77 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 77 aaaagatgct gactcagaaa a	21
	<210> 78 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 78	

	aacctaataat agaagacccc t	21
	<210> 79	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 79	
	aagaccccta tgcaattagc t	21
10	<210> 80	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 80	
	aaaaagcctg aagaacagca c	21
	<210> 81	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 81	
	aaatgggatt taatgcattc a	21
25	<210> 82	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 82	
	aacttcatga ctgtgatca a	21
	<210> 83	
35	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 83	
40	aacatcatga gttgcgtcaa g	21
	<210> 84	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Homo sapiens	
	<400> 84	
	aagcagcagg tccttaagaa c	21
50	<210> 85	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 85	
	aatctcatca acaagtactt t	21
	<210> 86	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 86	

	aattcagaac gtcagcacct g	21
	<210> 87	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 87	
10	aagaggagaa ctgacccaga a	21
	<210> 88	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 88	
	aaatgagcga ttggatggtg g	21
	<210> 89	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 89	
25	aagatcatca agggctccag t	21
	<210> 90	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Homo sapiens	
	<400> 90	
	aatgtgggttc gaataattac a	21
35	<210> 91	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 91	
	aaactcgaga tgactttgtg c	21
	<210> 92	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 92	
	aatcaacagc tgcagagggtt c	21
50	.	
	<210> 93	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 93	
	aaggatggaa ctatcttatg c	21
	<210> 94	
60	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 94	

	aatttcgacg atgccaccat g	21
	<210> 95	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 95	
10	aaccgacaag tgtgacaact c	21
	<210> 96	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 96	
	aaagaaatgt gtggtcattg a	21
	<210> 97	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 97	
25	aatc gatgg aactatacat c	21
	<210> 98	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Homo sapiens	
	<400> 98	
	aactatacat caggtgtatg t	21
35	<210> 99	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 99	
	aatggtttca cccatcagag c	21
	<210> 100	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 100	
50	aagggtcag ctacattcaa c	21
	<210> 101	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 101	
	aatacaacgt ccagcaacag t	21
	<210> 102	
60	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 102	

	aactccatgt ttcataaacc gg	22
5	<210> 103 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 103 aacgtgtatg gcttcgacat g	21
15	<210> 104 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 104 aagttccaga aatctgaaat a	21
25	<210> 105 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 105 aagaaaatcc agaacatgta g	21
35	<210> 106 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 106 aaaacagtag cttcggagaa g	21
45	<210> 107 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 107 aaggtaaaaa ggggtcacta t	21
55	<210> 108 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 108 aaaggggtca ctatggagtt c	21
	<210> 109 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 109 agcaccagca ctggctcatc aa	22
	<210> 110 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 110	

	agagccagaa gagctgcta	19
	<210> 111	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 111	
10	aaccgacaag tgtgacaact	20
	<210> 112	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 112	
	tgtgccttgc gggcagta	18
	<210> 113	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 113	
25	caccaccacc accaaatgaa	20
	<210> 114	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Homo sapiens	
	<400> 114	
	catccattcg acgcctttga	20
35	<210> 115	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 115	
	ccagcagcac agtcaacaa a	21
	<210> 116	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 116	
50	tggtagcttc tgcttcacaa	20
	<210> 117	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 117	
	ccagagctgc actcattcc	19
	<210> 118	
60	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 118	
65	cactgttggt gataaagcaa tt	22

5	<210> 119 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 119 ggataaaggc tacttaacaa ag	22
10	<210> 120 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 120 ccactttgcc atctctacac	20
20	<210> 121 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 121 gagccgagga ggttgaa g	19
30	<210> 122 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 122 ctcctctggg tctatagtgt	20
35	<210> 123 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 123 gaccctggtg gcggtgaa	18
45	<210> 124 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 124 ggtgcctgca gcatcttca	19
50	<210> 125 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 125 ggagagccct ggcacgta	18
60	<210> 126 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
65	<400> 126 ccttcatctg caggttcttg	20

	<210> 127	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 127	
	acgacggaca cattaattac t	21
	<210> 128	
10	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 128	
15	tccatgctgc agctgatga	19
	<210> 129	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 129	
	ccttcggcaa agggagagt	19
25	<210> 130	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 130	
	ctggatgagt tcagagagtt t	21
	<210> 131	
	<211> 18	
35	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 131	
	gcctcgacag gcagagat	18
40	<210> 132	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 132	
	cttgtagctg aagatgtcaa t	21
	<210> 133	
50	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 133	
55	ctctatgccc gggacaagt	19
	<210> 134	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Homo sapiens	
	<400> 134	
	aagacatgtc gaagccatac a	21

	<210> 135	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 135	
	aatgtcatcc acgccagcga c	21
10	<210> 136	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 136	
	aatggaaagt gcgtcatcct a	21
20	<210> 137	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 137	
	aagttcacia ttggcgacca c	21
25	<210> 138	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 138	
	aagtgcctca gcatcgacaa c	21
35	<210> 139	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 139	
	aagagttacc tagaagcacc t	21
45	<210> 140	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 140	
	aaaaaaccga atcttcaggt c	21
50	<210> 141	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 141	
	aaactctctg aactcatcca g	21
60	<210> 142	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 142	
	aactggatcc aaaaaaccat t	21
65	<210> 143	

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 143 aatgaccgtt acattgtcaa t	21
	<210> 144	
	<211> 21	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 144 aaaatatggg aacctacaat a	21
15		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Al menos un inhibidor ARNip o ARNhc del gen celular S100A10 para su uso en la disminución de la resistencia a un fármaco quimioterapéutico de una célula tumoral de cáncer de ovario que se trata con el fármaco quimioterapéutico, en donde la célula es menos resistente al fármaco quimioterapéutico en presencia del inhibidor que en ausencia del inhibidor.
- 10 2. El inhibidor de la reivindicación 1, en donde el inhibidor es un ARNip que tiene 19, 20 o 21 nucleótidos de longitud.
3. El inhibidor de la reivindicación 1, en donde el inhibidor es un ARNhc que forma un bucle en horquilla con brazos que tienen 19, 20 o 21 nucleótidos de longitud.
- 15 4. El inhibidor de la reivindicación 1, en donde el agente quimioterapéutico es cisplatino.
5. El inhibidor de la reivindicación 1, en donde el ARNip es SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 61.
- 20 6. Uso de al menos un inhibidor ARNip o ARNhc del gen celular S100A10 en la fabricación de un medicamento para disminuir la resistencia a un fármaco quimioterapéutico de una célula tumoral de cáncer de ovario que se trata con el fármaco quimioterapéutico, en donde la célula es menos resistente al fármaco quimioterapéutico en presencia del inhibidor que en ausencia del inhibidor.
- 25 7. Una combinación de un agente o agentes quimioterapéutico(s) y al menos un inhibidor ARNip o ARNhc del gen celular S100A10 para su uso en la inhibición del crecimiento de una célula tumoral de cáncer de ovario.
8. La combinación de la reivindicación 7, en donde el agente quimioterapéutico se basa en platino.
- 30 9. La combinación de la reivindicación 7, en donde el inhibidor es un ARNip identificado como SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 61.
- 35 10. Uso de una combinación de un agente o agentes quimioterapéutico(s) y al menos un inhibidor ARNip o ARNhc del gen celular S100A10 en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de una célula tumoral de cáncer de ovario.
- 40 11. Un método *in vitro* de predecir si el tumor de una paciente de cáncer de ovario es resistente a un fármaco quimioterapéutico que comprende los pasos de:
 - a. detectar una cantidad de un gen expresado o producto génico codificado por dicho gen expresado en una muestra biológica tomada de la paciente, en donde el gen expresado es S100A10;
 - b. detectar una cantidad de un gen expresado o producto génico codificado por el mismo en una muestra control, en donde el gen expresado es S100A10;
 - c. comparar la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (a) con la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (b),
- 45 en donde se predice que la paciente es resistente al fármaco quimioterapéutico cuando la cantidad detectada en el paso (a) es mayor que la cantidad detectada en el paso (b) en un factor de al menos el 20%.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la quimioterapia es quimioterapia basada en cisplatino.
- 50 13. Un método *in vitro* para seguir la evolución de la enfermedad del cáncer de ovario en una paciente, que comprende los pasos de:
 - a. detectar una cantidad de un gen expresado o producto génico codificado por el gen expresado en una muestra biológica tomada de la paciente, en donde el gen expresado es S100A10;
 - 55 b. repetir el paso (a) usando una muestra biológica recogida posteriormente obtenida de la paciente; y
 - c. comparar la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (a) con la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (b), en donde el cáncer ha progresado cuando la cantidad detectada en el paso (b) no es menor que la cantidad detectada en el paso (a) para S100A10.
- 60 14. Un método *in vitro* para identificar un compuesto que disminuye la resistencia a fármacos de una célula tumoral de cáncer de ovario quimiorresistente que comprende los pasos de:
 - 65 a. poner en contacto con un compuesto de prueba junto con un fármaco quimioterapéutico a una concentración a la que es resistente una célula que expresa un gen que se sobreexpresa en células de cáncer de ovario quimiorresistentes, en donde el gen es S100A10;

- b. detectar la expresión del gen en presencia y ausencia del compuesto de prueba; y
 - c. comparar la expresión del gen en presencia y ausencia del compuesto de prueba, en donde un compuesto se identifica como un compuesto que inhibe el crecimiento de una célula tumoral de cáncer de ovario quimiorresistente si la expresión del gen en presencia del compuesto de prueba se reduce relativa a la expresión del gen en ausencia del compuesto de prueba, y donde el crecimiento de la célula tumoral de cáncer de ovario disminuye en presencia del compuesto.
- 5
15. Un método *in vitro* para seguir la eficacia de una composición farmacéutica como un agente para tratar cáncer de ovario en una paciente que comprende los pasos de:
- 10
- a. detectar una cantidad de un gen expresado o producto génico codificado por el mismo en una muestra biológica tomada de una paciente, en donde el gen expresado es S100A10;
 - b. repetir el paso (a) usando una muestra biológica recogida posteriormente obtenida de la paciente después de la administración de una cantidad de una composición farmacéutica a la paciente; y
 - c. comparar la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (a) con la cantidad del gen expresado o producto génico detectado en el paso (b), en donde la eficacia de la composición farmacéutica se sigue detectando cambios en la cantidad de gen expresado o producto génico en la muestra biológica recogida posteriormente comparada con la muestra biológica tomada en el paso (a), y donde el crecimiento de la célula tumoral de cáncer de ovario disminuye en presencia de la composición.
- 15
- 20

Expresión del ARNm 756595 en líneas celulares de cáncer epitelial de ovario

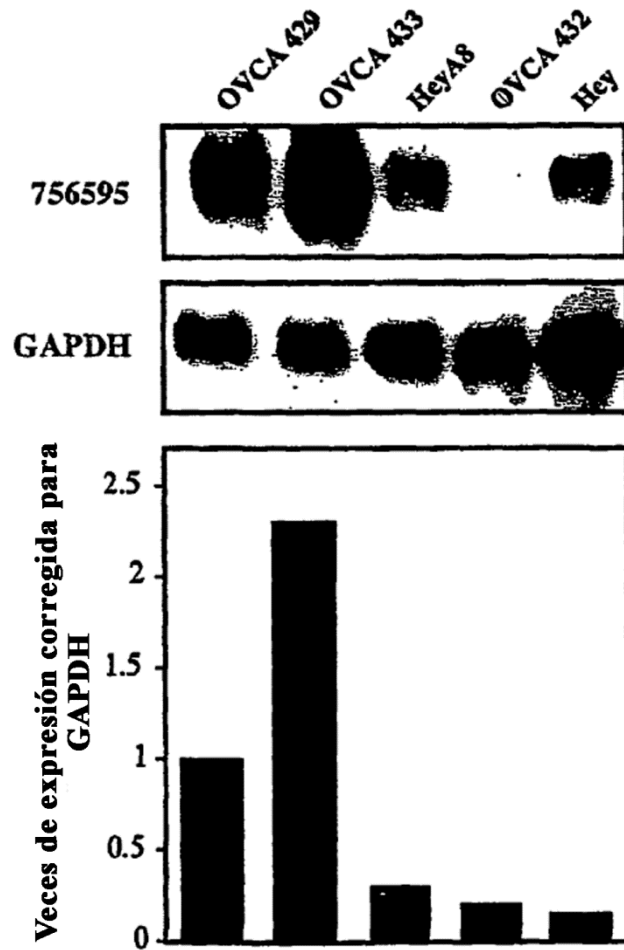


Figura 1

**Expresión del ARNm 810612 en líneas celulares de
cáncer epitelial de ovario**

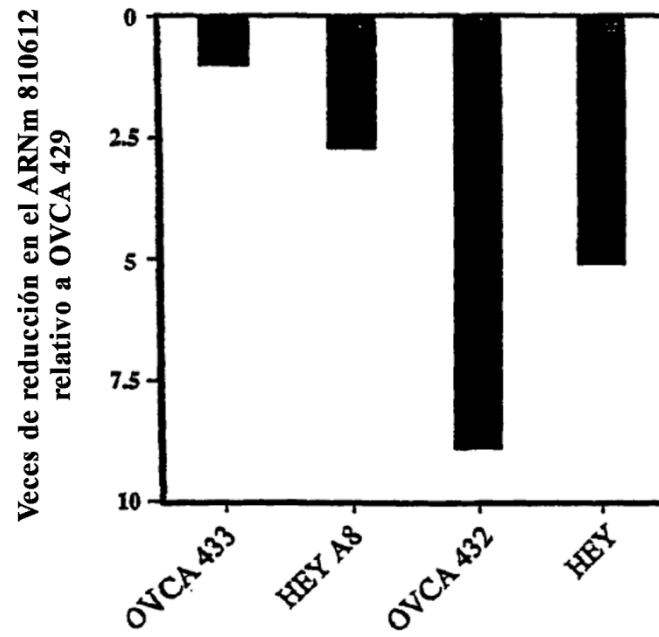


Figura 2

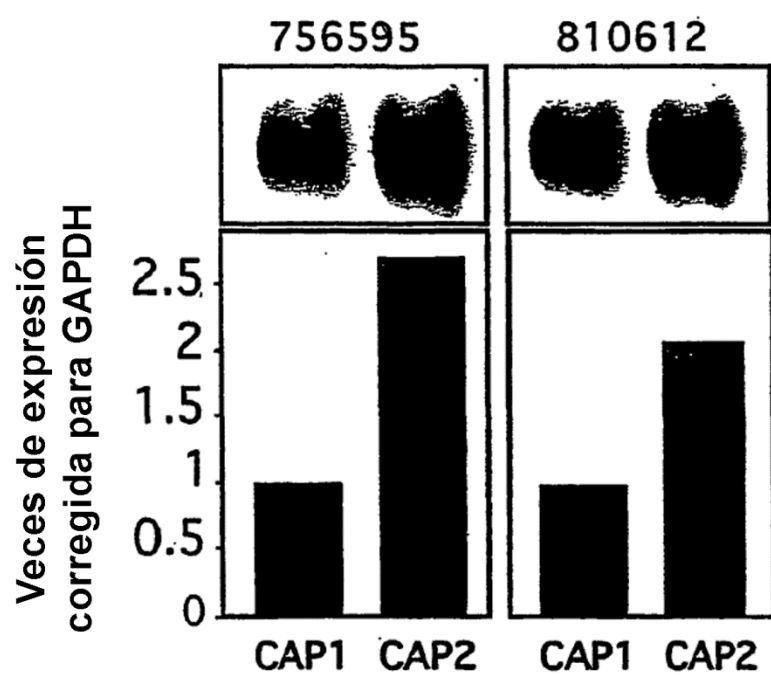
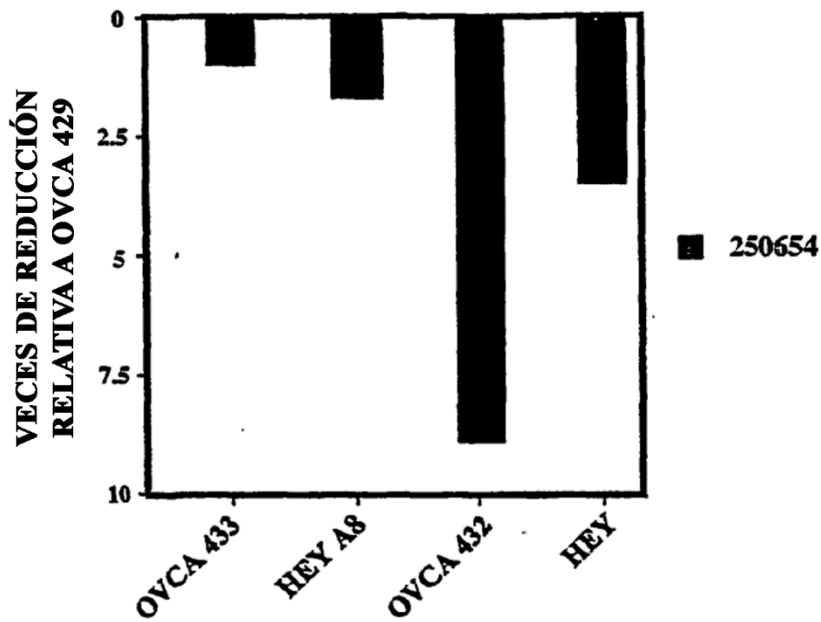


Figura 3

Validación de la expresión de 250654 en líneas celulares de cáncer epitelial de ovario mediante PCR en tiempo real cuantitativa



Secuencia de la sonda

FAM-CGCGTATGAACTGGGCTTATGTGACGCG-DABCYL

Figura 4

**Expresión de 250654 en una paciente de cáncer
epitelial de ovario no respondedora a lo largo del
tiempo**

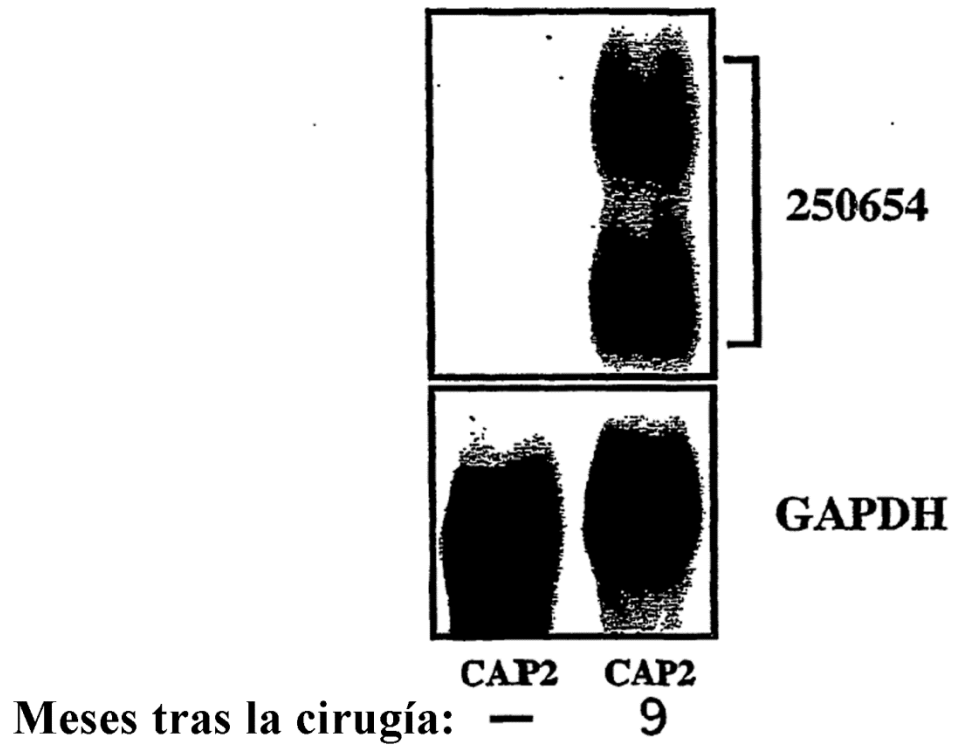
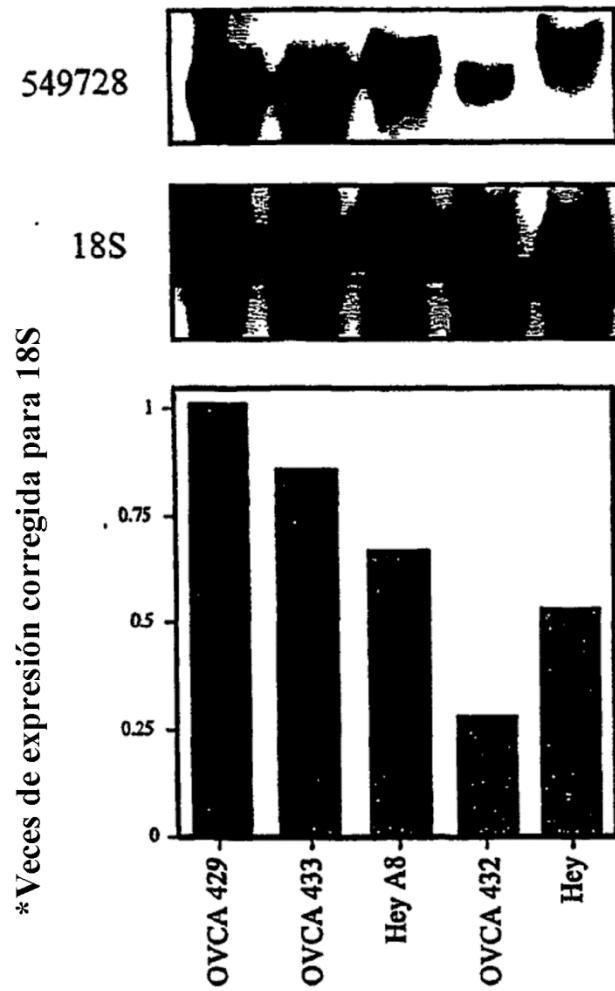
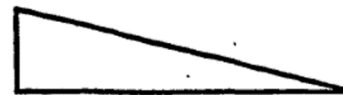


Figura 5

Análisis por transferencia Northern de 549728



*Los puntos muestran medias de duplicados



Resistencia a cisplatino

Figura 6

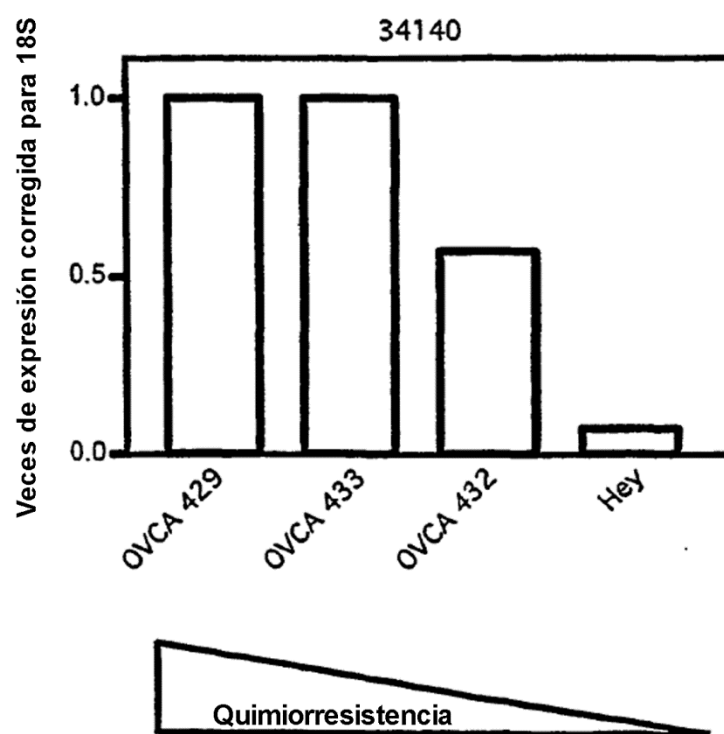


Figura 7

**Expresión de la proteína 39093 en extractos de proteína total
de líneas celulares de cáncer epitelial de ovario**

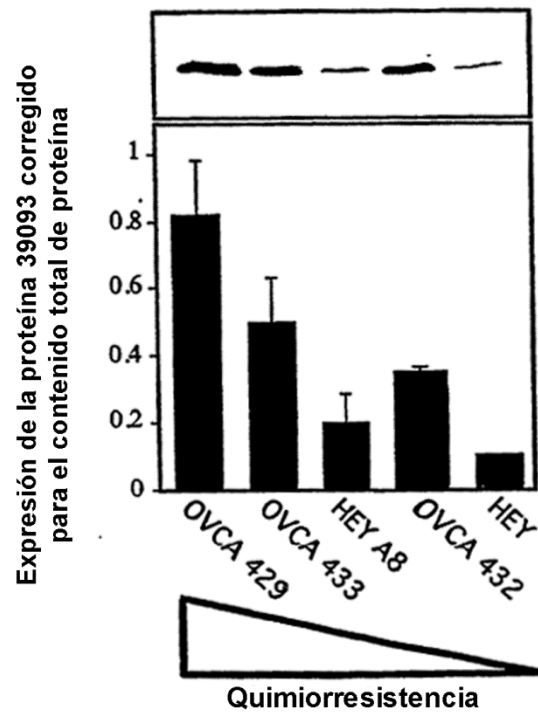


Figura 8

**Expresión del ARNm 39093 en pacientes con
cáncer epitelial de ovario**

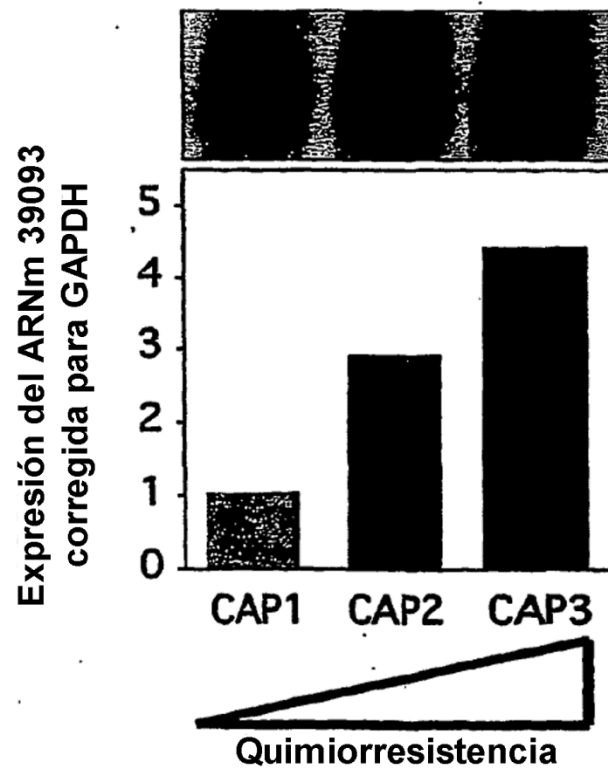


Figura 9

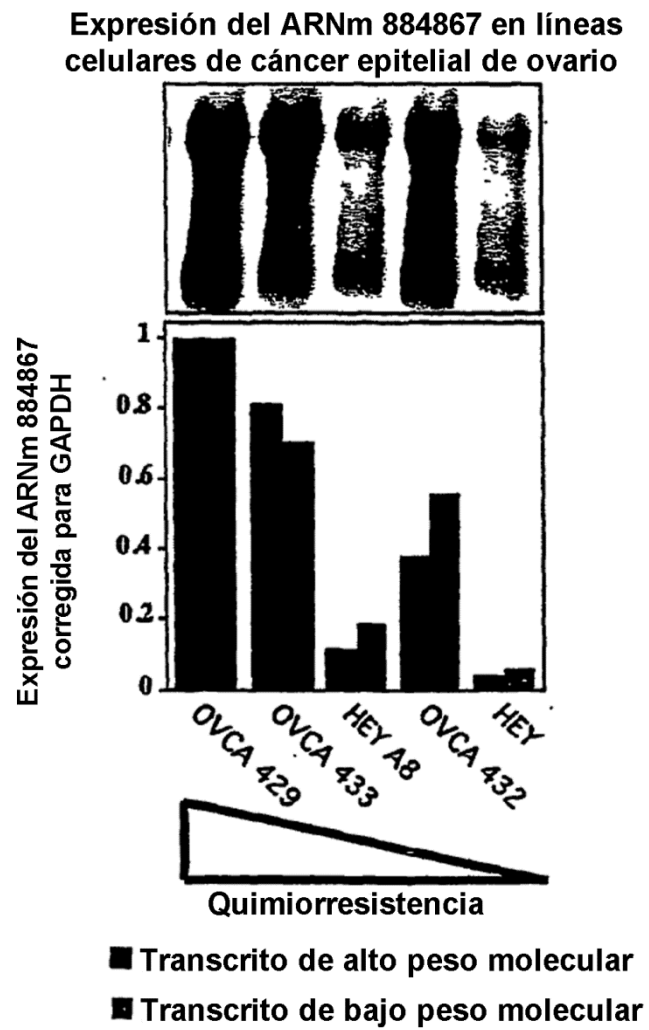


Figura 10

**Expresión del ARNm 884867 en una paciente con
cáncer epitelial de ovario con el tiempo**

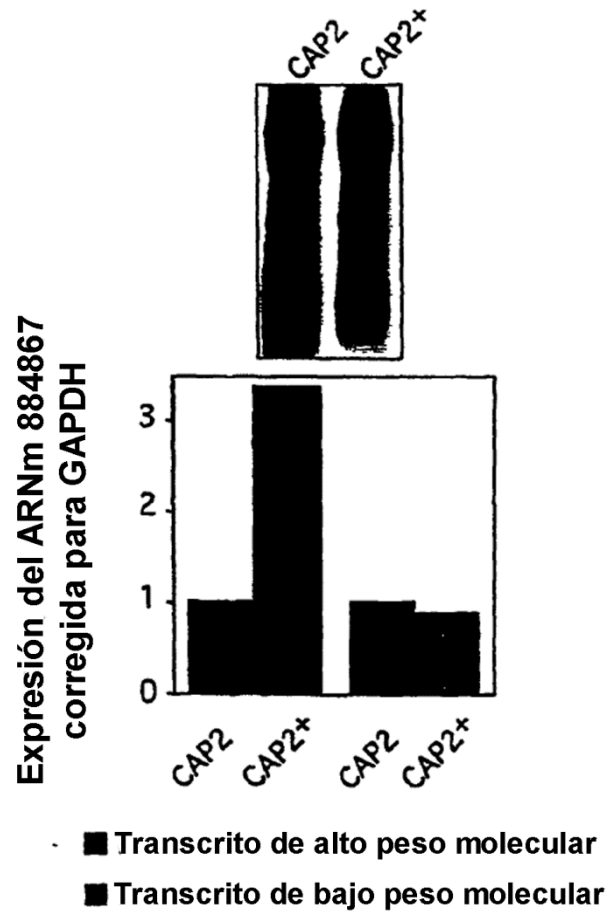
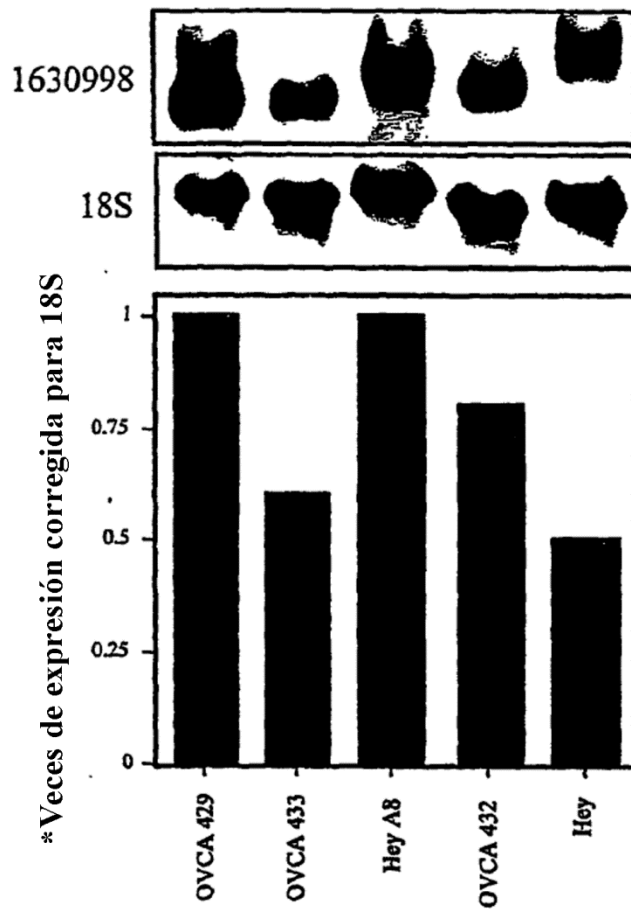


Figura 11

Análisis por transferencia Northern de 1630998



*Los puntos mostrados son medias de duplicados

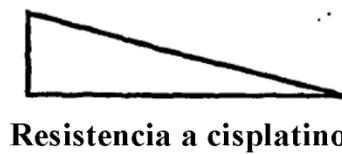
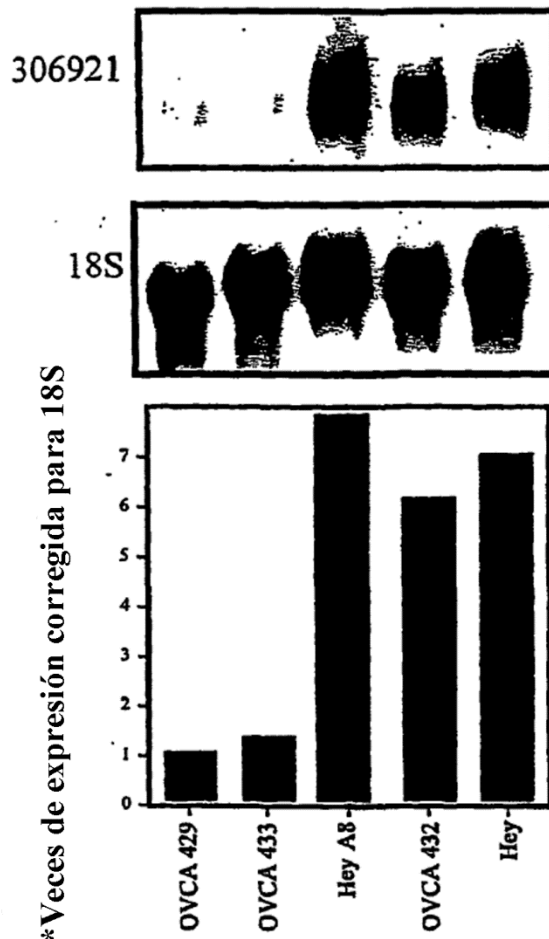
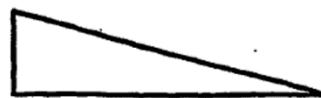


Figura 12

Análisis por transferencia Northern de 306921



*Los puntos mostrados son medias de duplicados



Resistencia a cisplatino

Figura 13

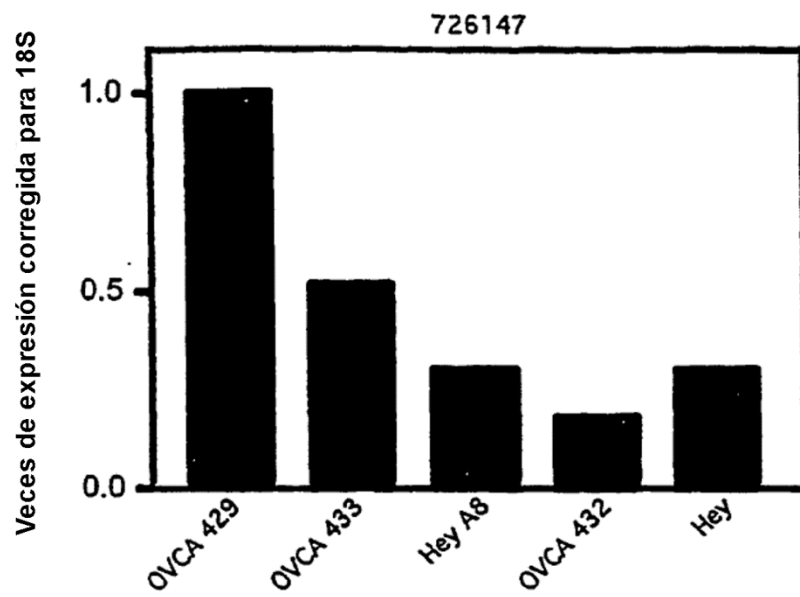


Figura 14

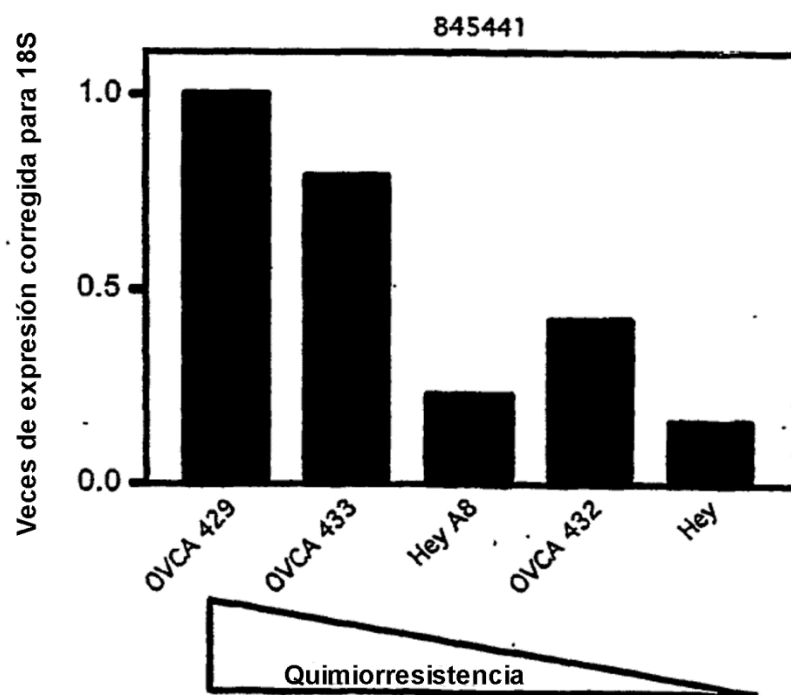


Figura 15

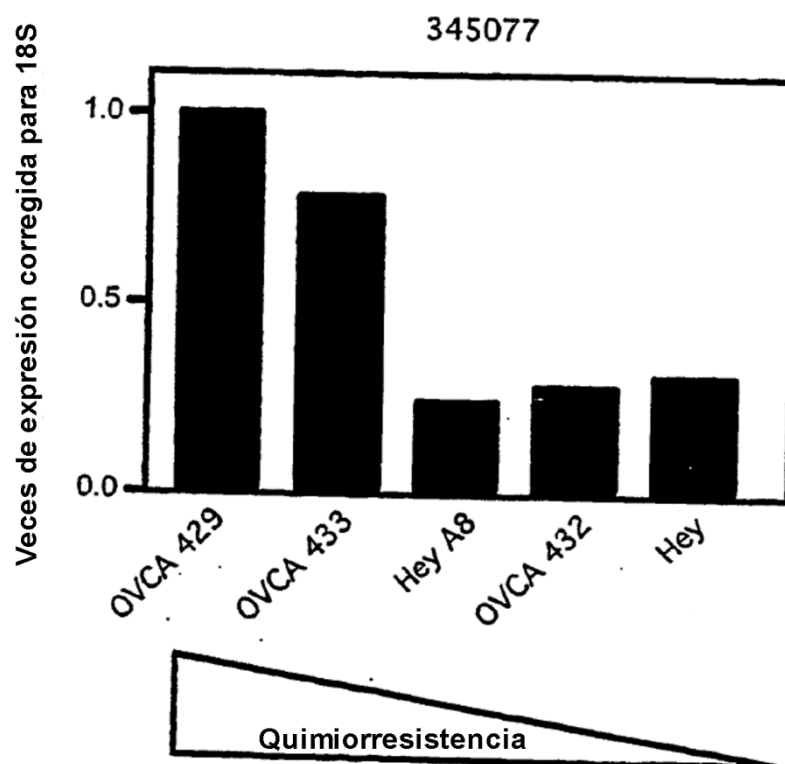


Figura 16

Expresión del ARNm 809784 en líneas celulares de cáncer epitelial de ovario

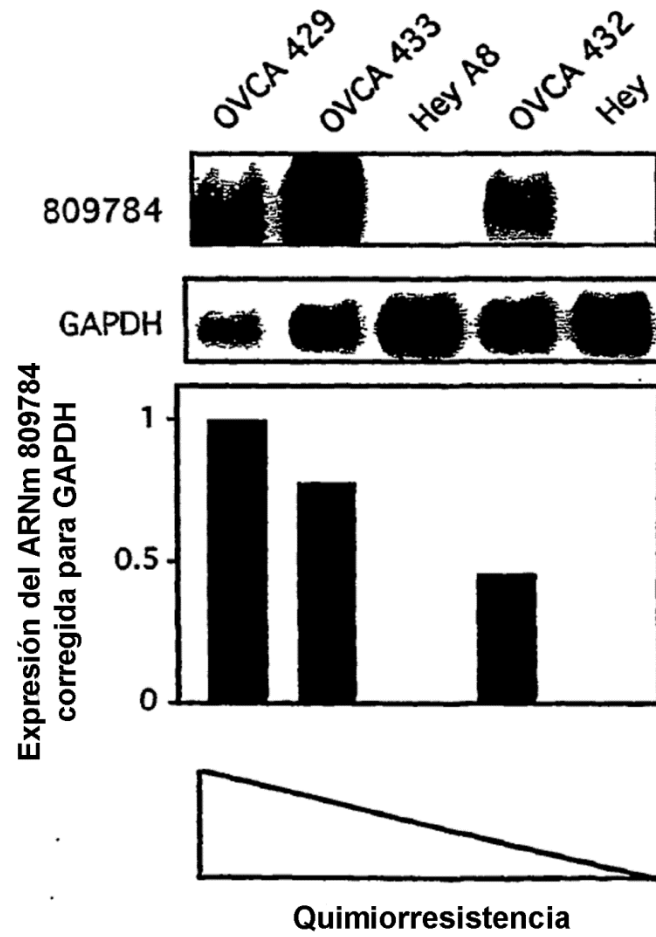
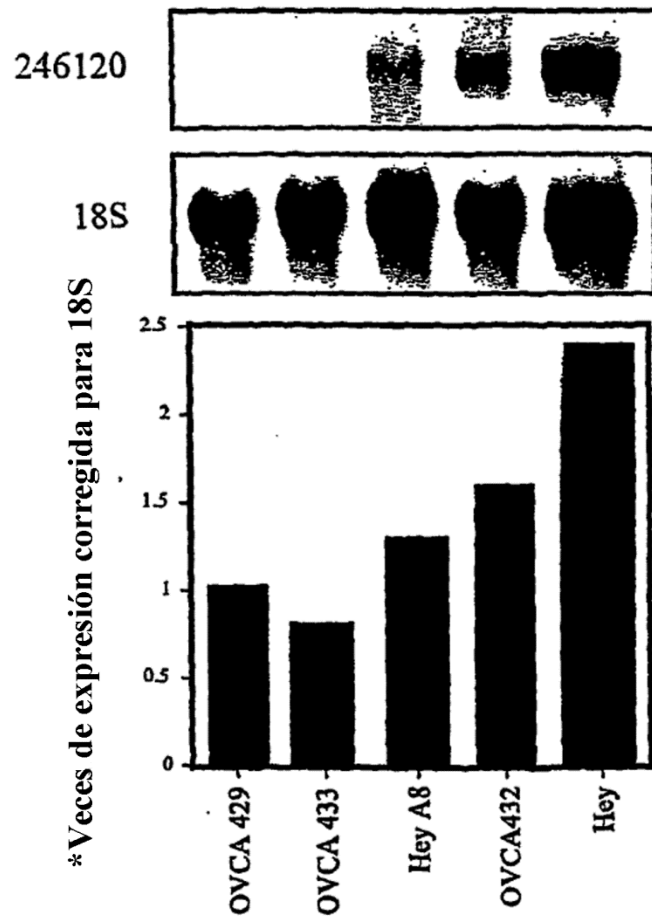


Figura 17

Análisis por transferencia Northern de 246120



*Los puntos mostrados son medias de duplicados

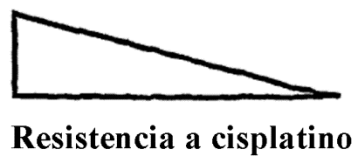
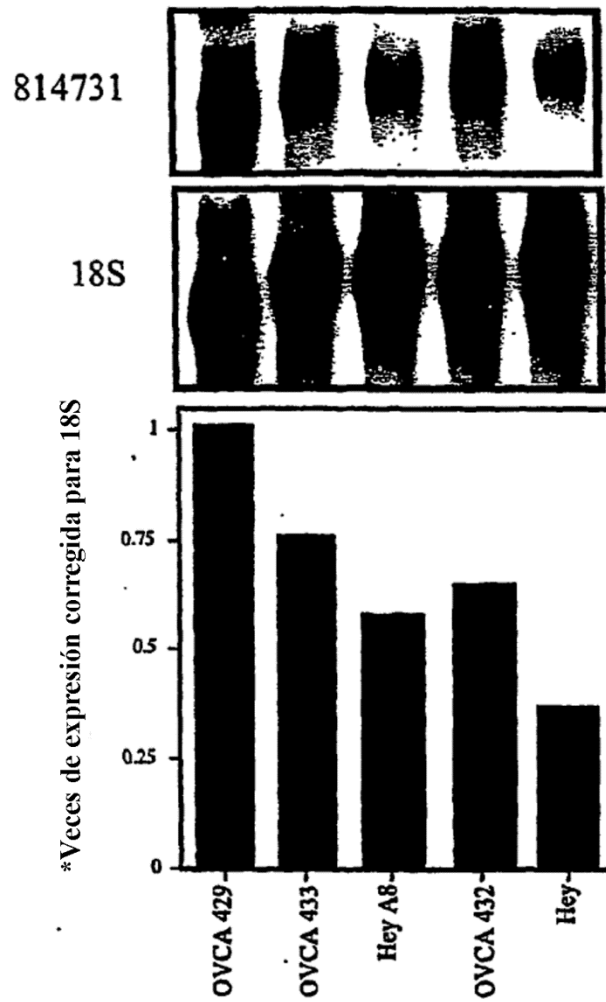


Figura 18

Análisis por transferencia Northern de 814731



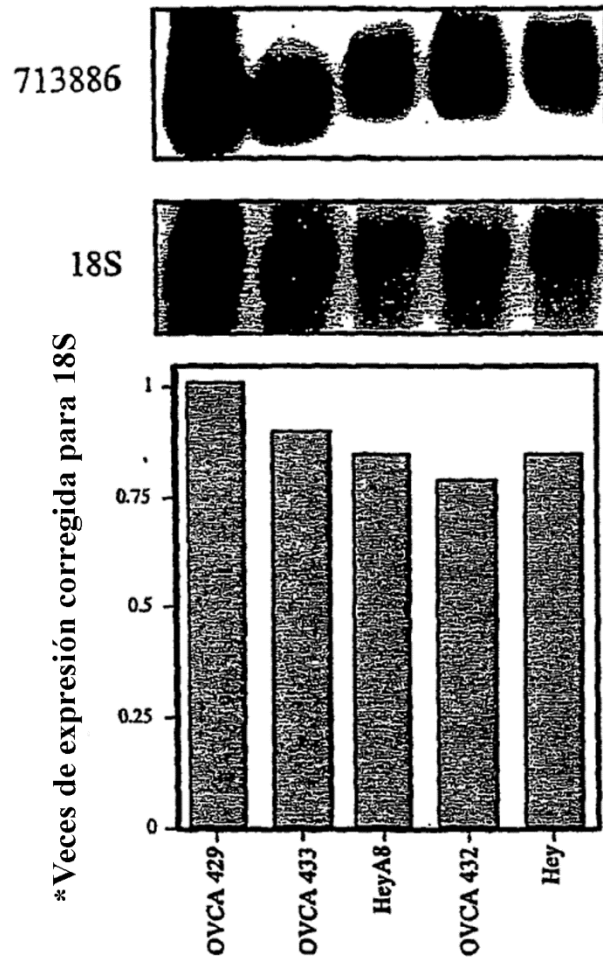
*Los puntos mostrados son medias de duplicados



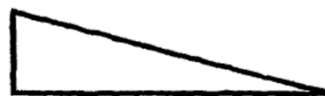
Resistencia a cisplatino

Figura 19

Análisis por transferencia Northern de 713886



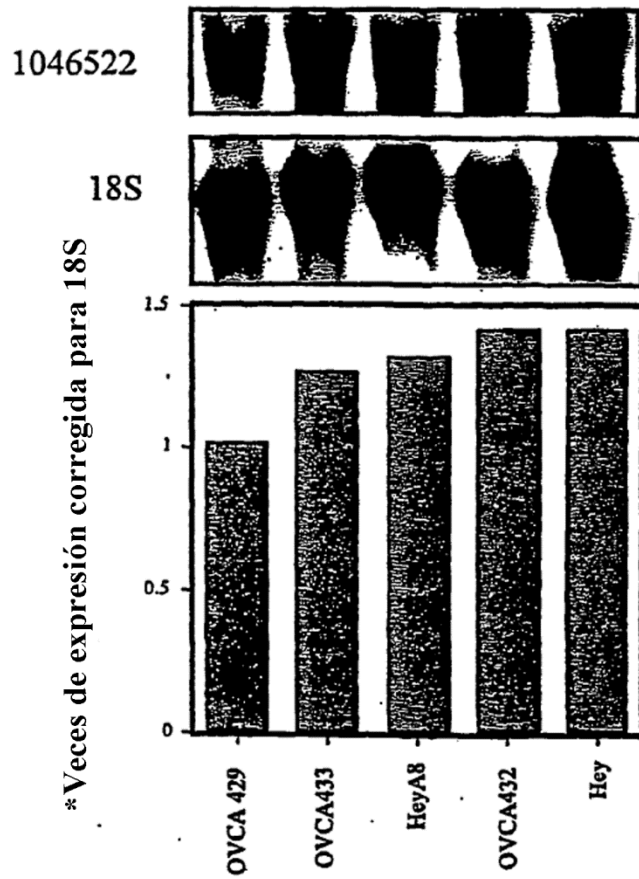
*Los puntos mostrados son medias de duplicados



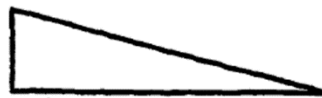
Resistencia a cisplatino

Figura 20

Análisis por transferencia Northern de 104622



*Los puntos mostrados son medias de duplicados



Resistencia a cisplatino

Figura 21

Análisis por transferencia Northern de 897594

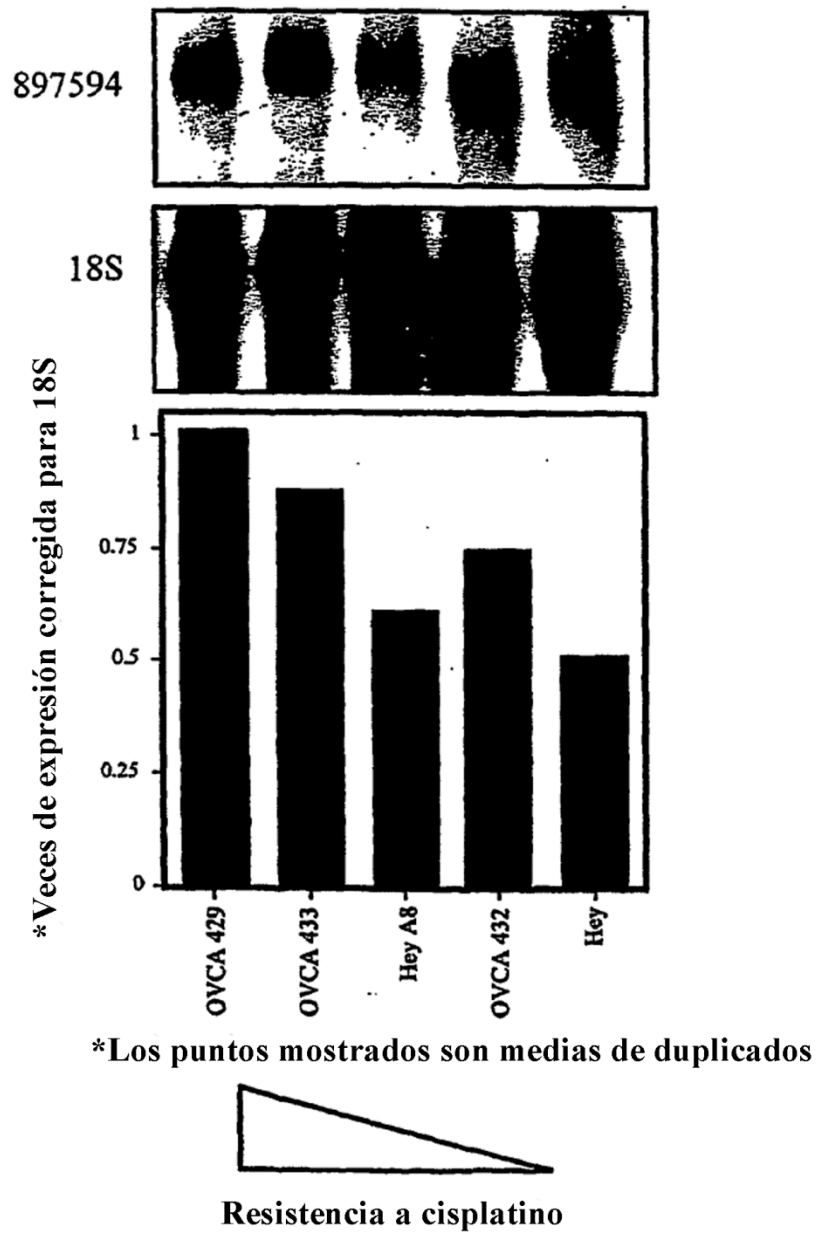
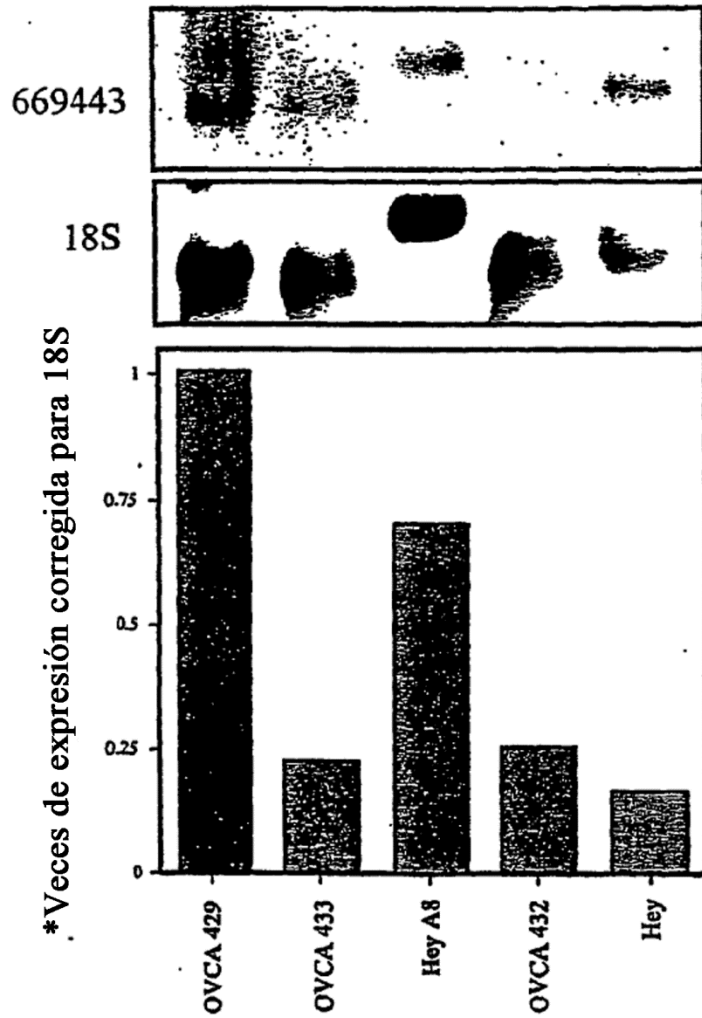
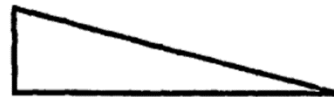


Figura 22

Análisis por transferencia Northern de 669443



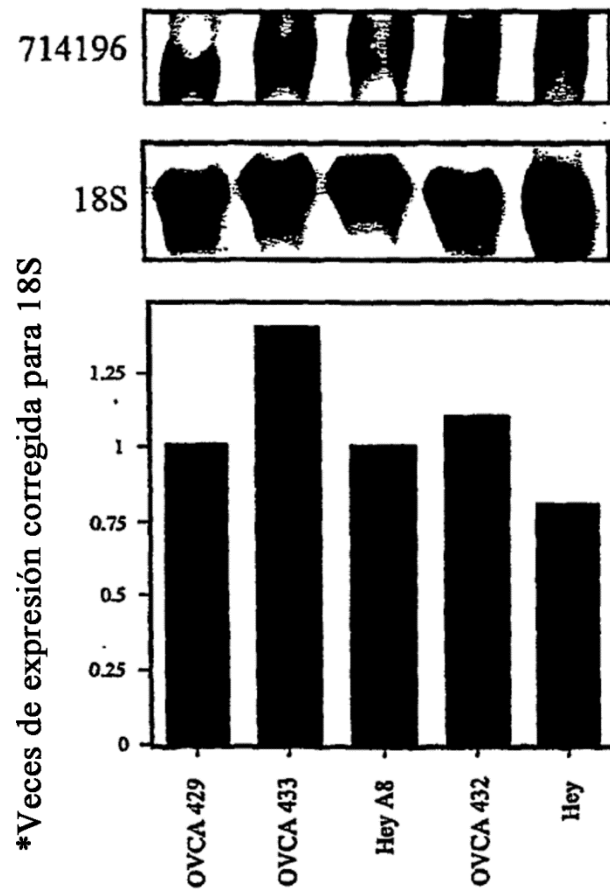
*Los puntos mostrados son medias de duplicados



Resistencia a cisplatino

Figura 23

Análisis por transferencia Northern de 714196



*Los puntos mostrados son medias de duplicados

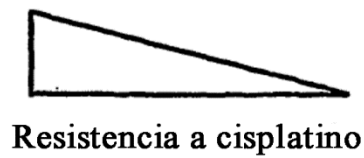
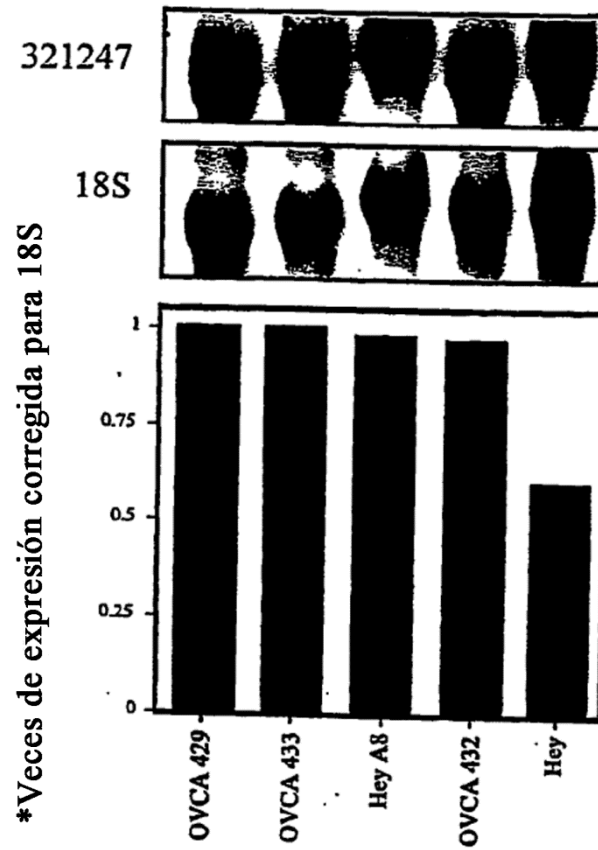


Figura 24

Análisis por transferencia Northern de 321247



*Los puntos mostrados son medias de duplicados

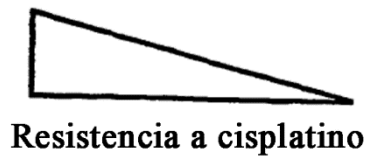
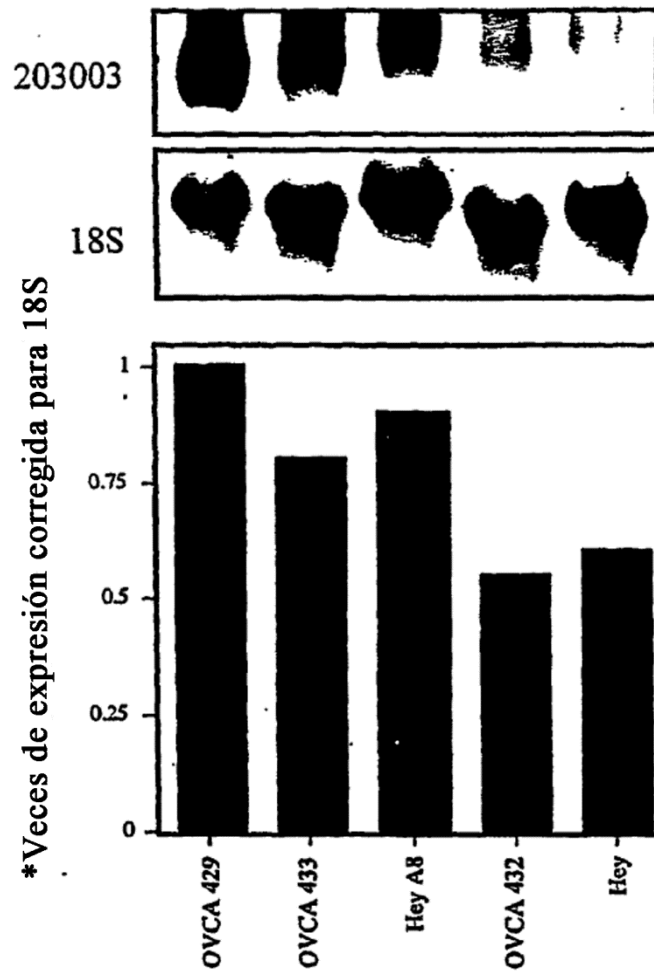


Figura 25

Análisis por transferencia Northern de 203003



*Los puntos mostrados son medias de duplicados

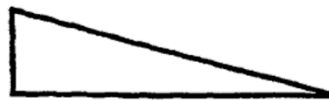


Figura 26

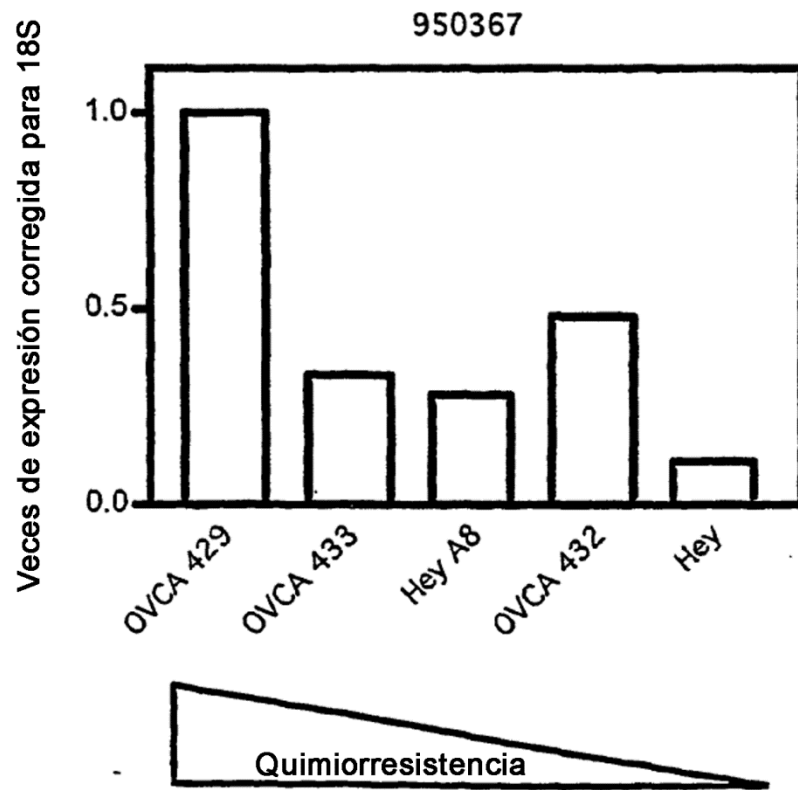


Figura 27

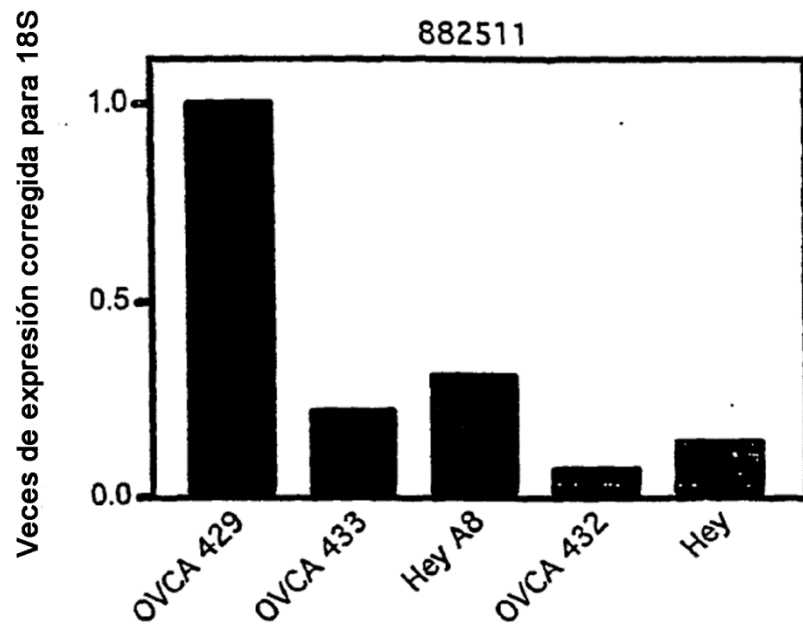


Figura 28

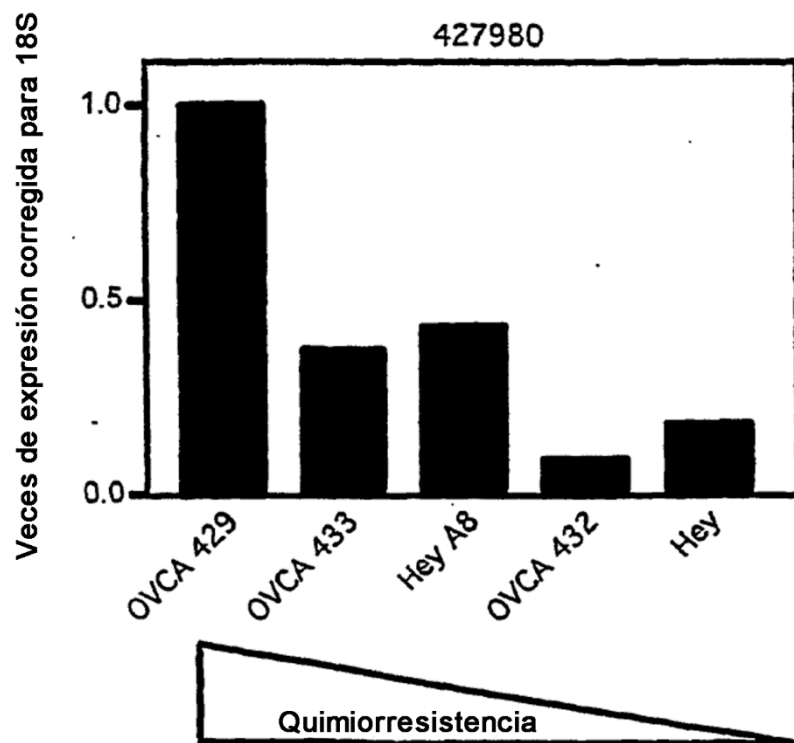


Figura 29

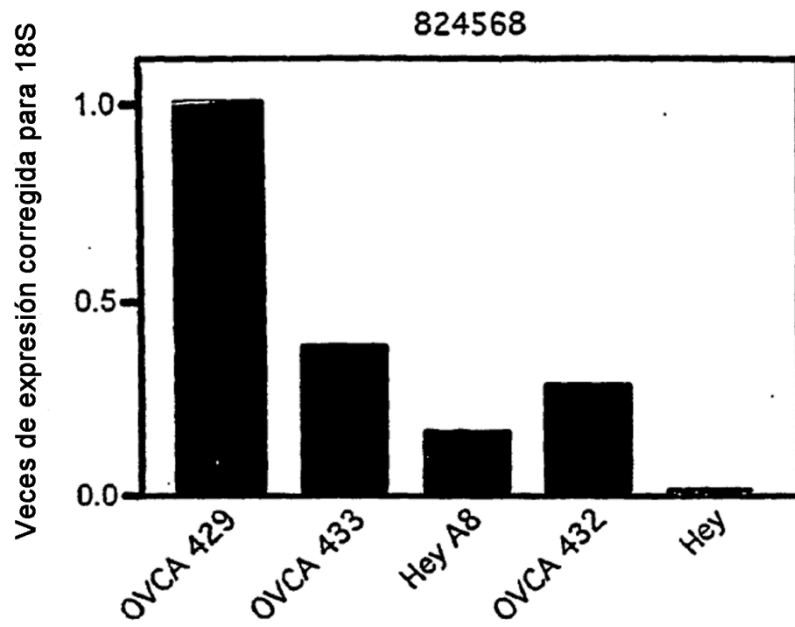


Figura 30

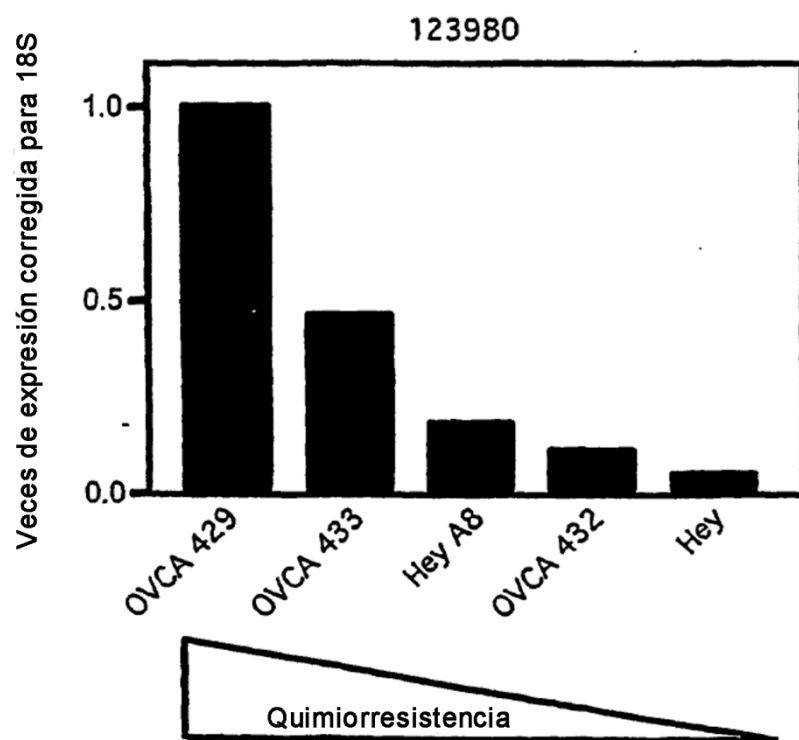


Figura 31

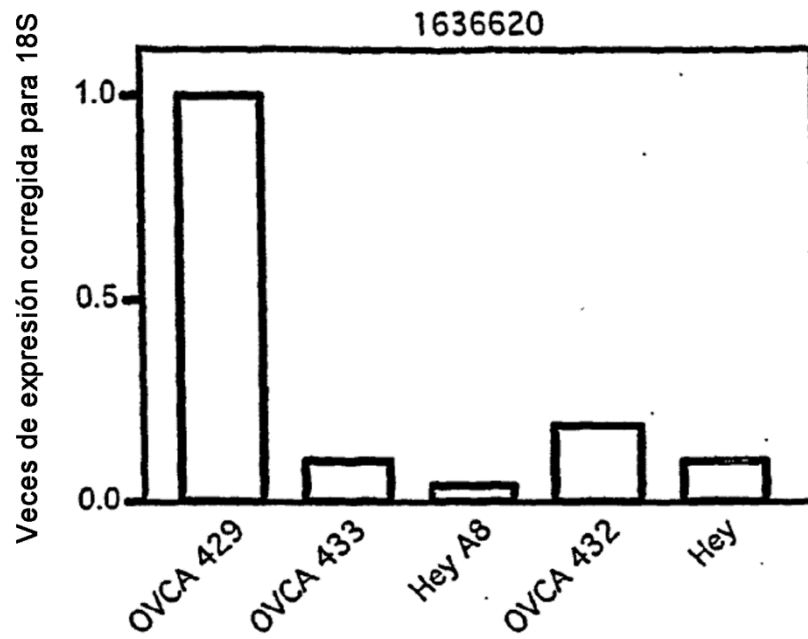


Figura 32

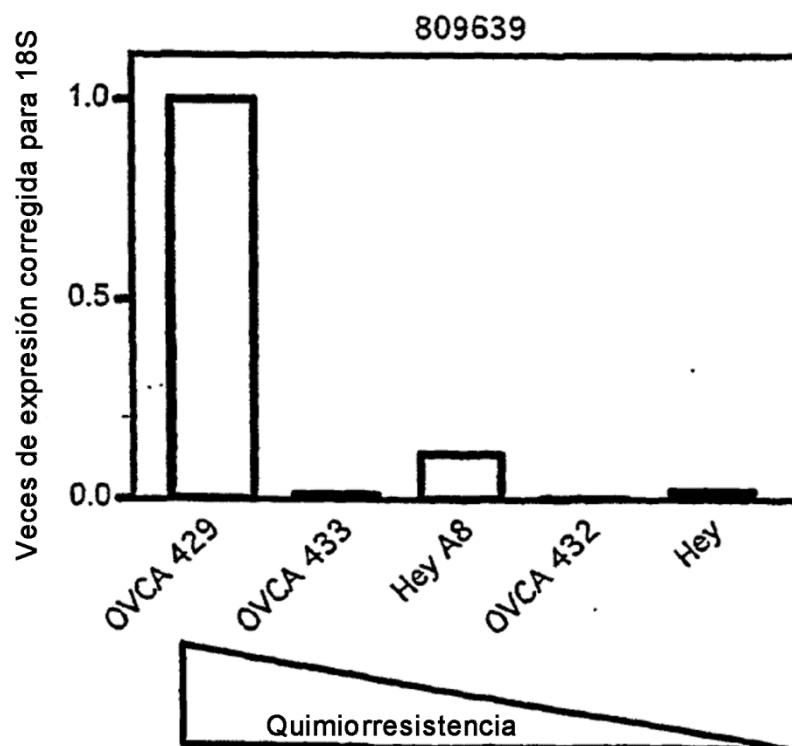


Figura 33

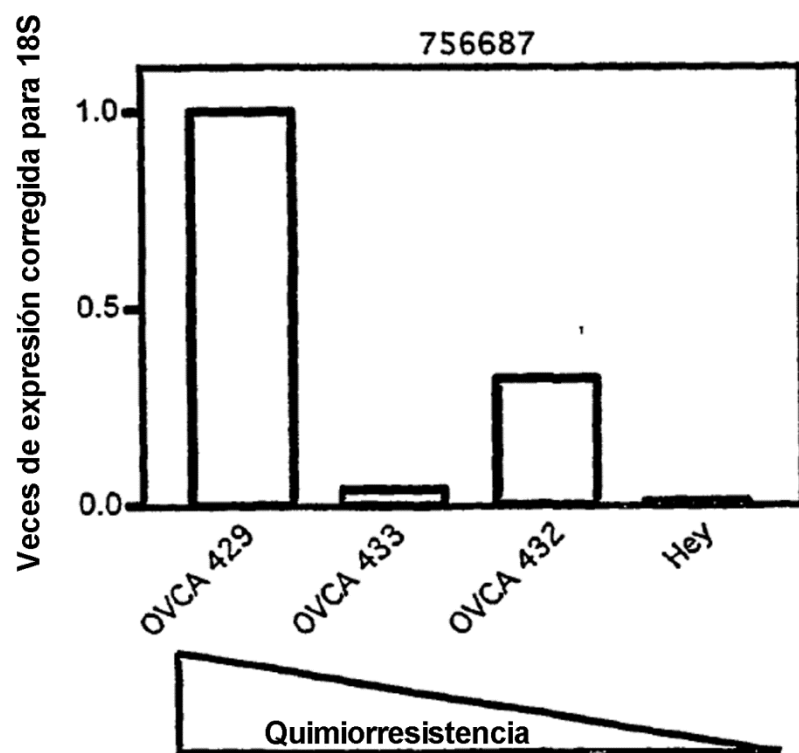


Figura 34

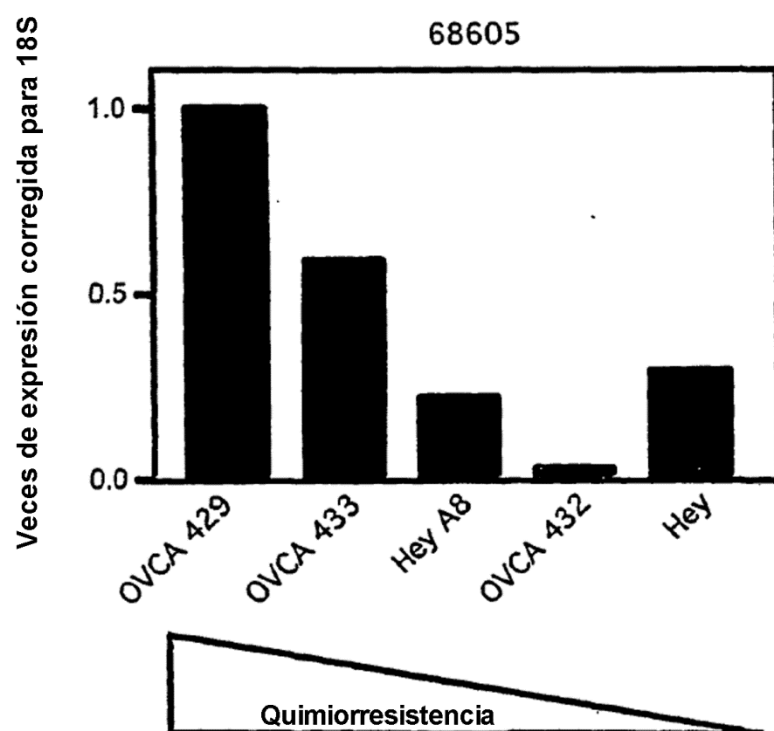


Figura 35

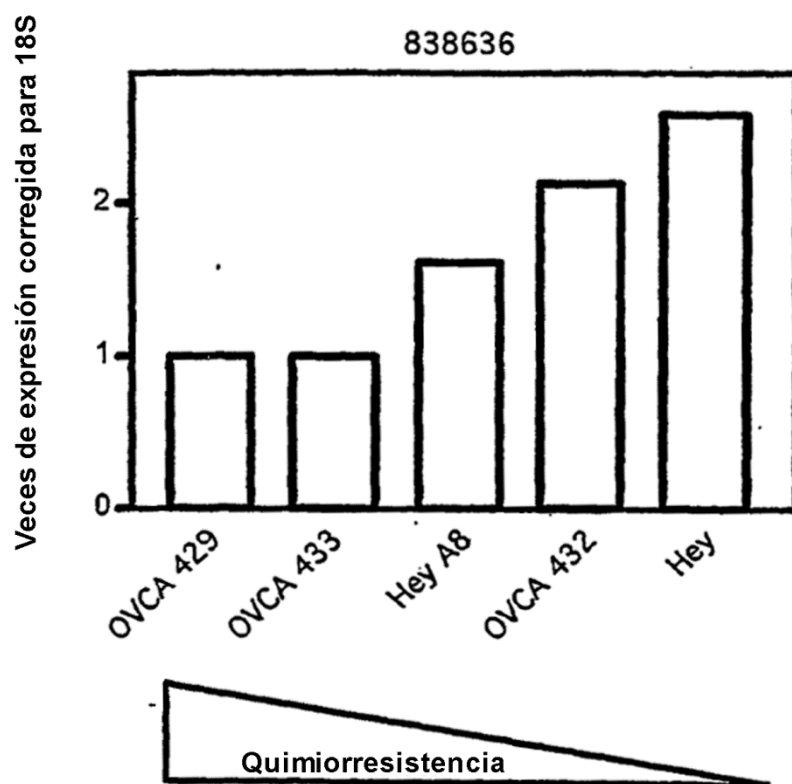
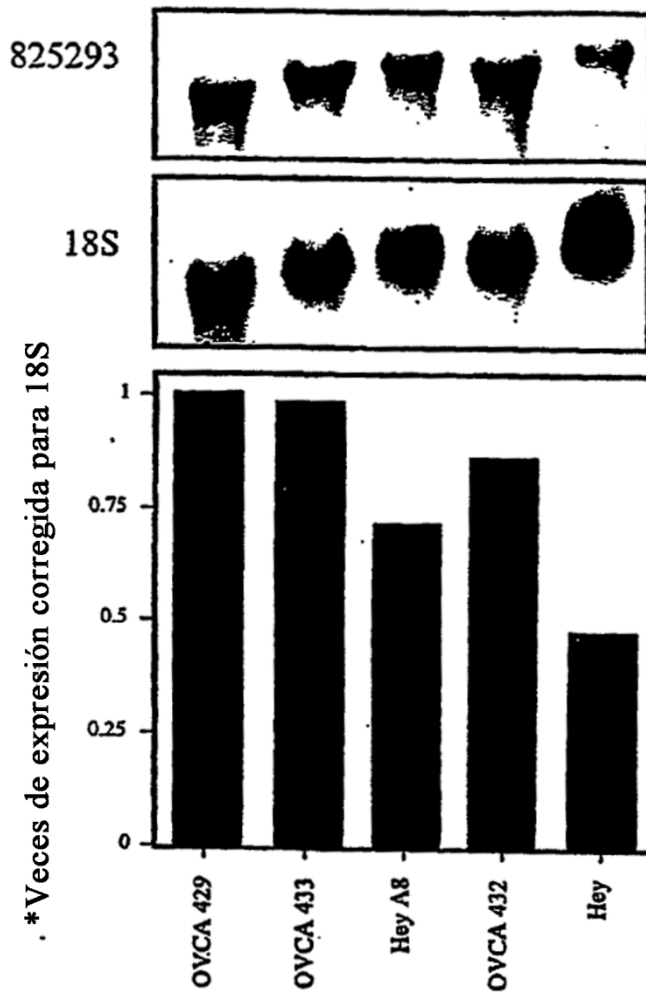
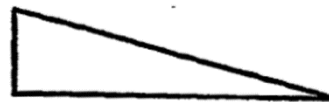


Figura 36

Análisis por transferencia Northern de 825293



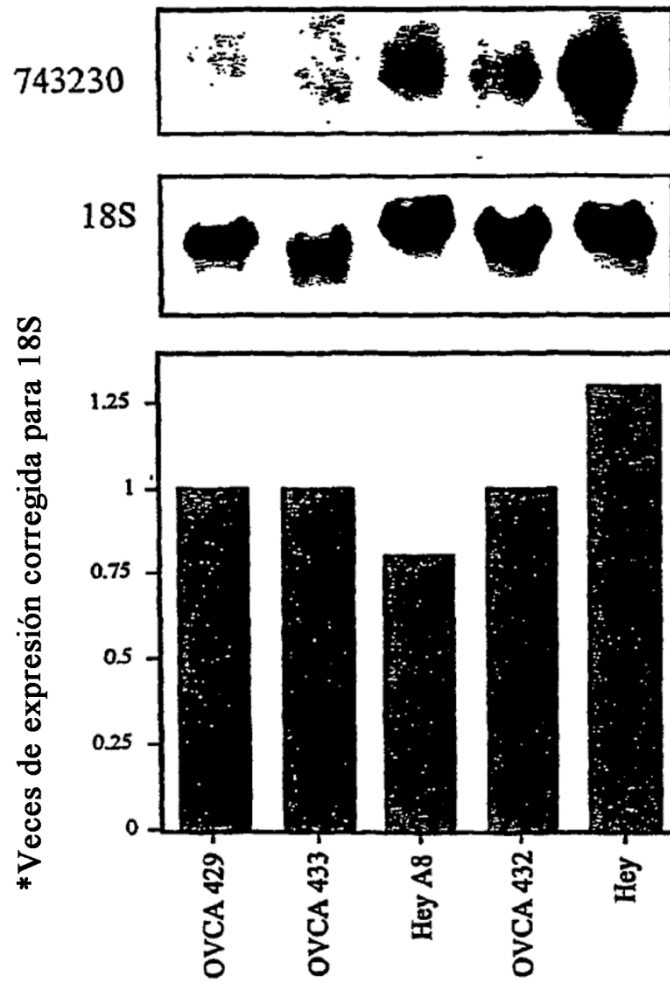
*Los puntos mostrados son medias de duplicados



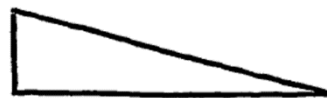
Resistencia a cisplatino

Figura 37

Análisis por transferencia Northern de 743230



*Los puntos mostrados son medias de duplicados



Resistencia a cisplatino

Figura 38

**Líneas celulares de cáncer epitelial de ovario ordenadas
según sus niveles de resistencia a cisplatino**

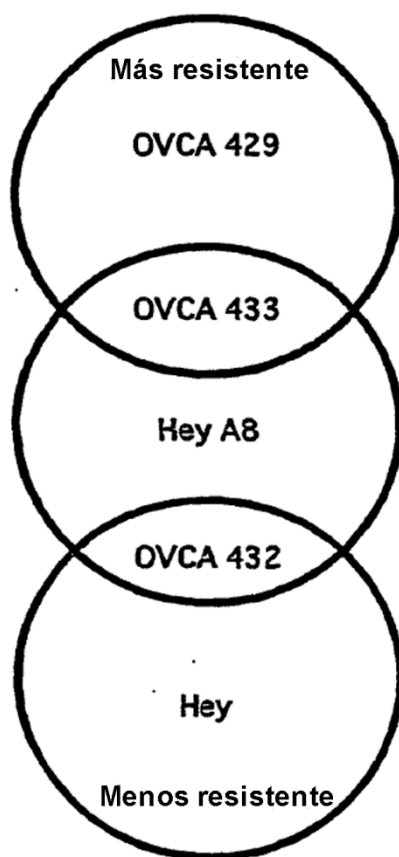
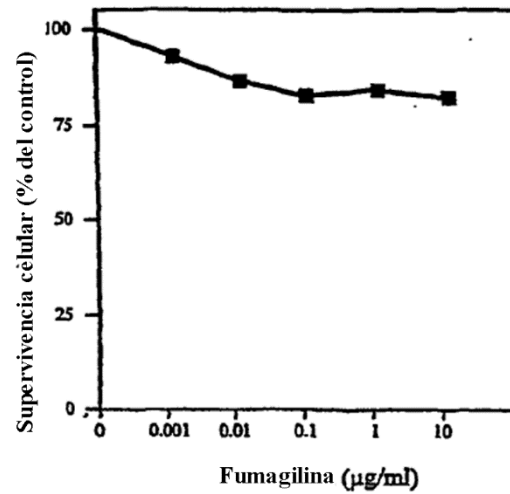


Figura 39

Supervivencia de células OVCA 429 tras 4 horas de exposición a fumagilina

(Todos los puntos mostrados son medias de dos experimentos independientes)



Supervivencia de células OVCA 429 tras 4 horas de exposición a cisplatino solo o combinaciones de cisplatino y fumagilina

(Todos los puntos mostrados son medias de dos experimentos independientes)

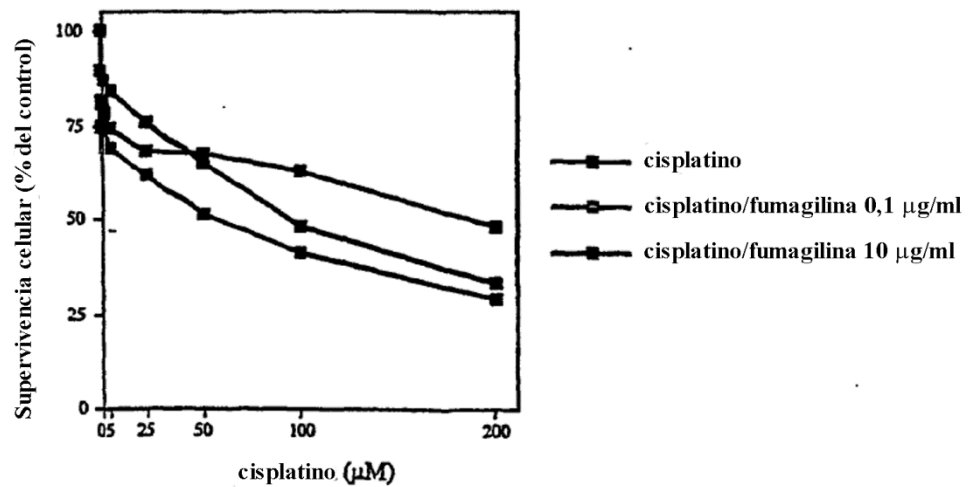
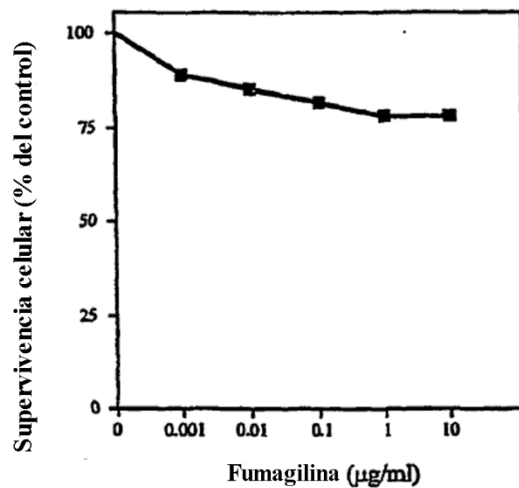


Figura 40

Supervivencia de células OVCA 429 tras 8 horas de exposición a fumagilina

(Todos los puntos mostrados son medias de dos experimentos independientes)

**Supervivencia de células OVCA 429 tras 8 horas de exposición a cisplatino solo o combinaciones de cisplatino y fumagilina**

(Todos los puntos mostrados son medias de dos experimentos independientes)

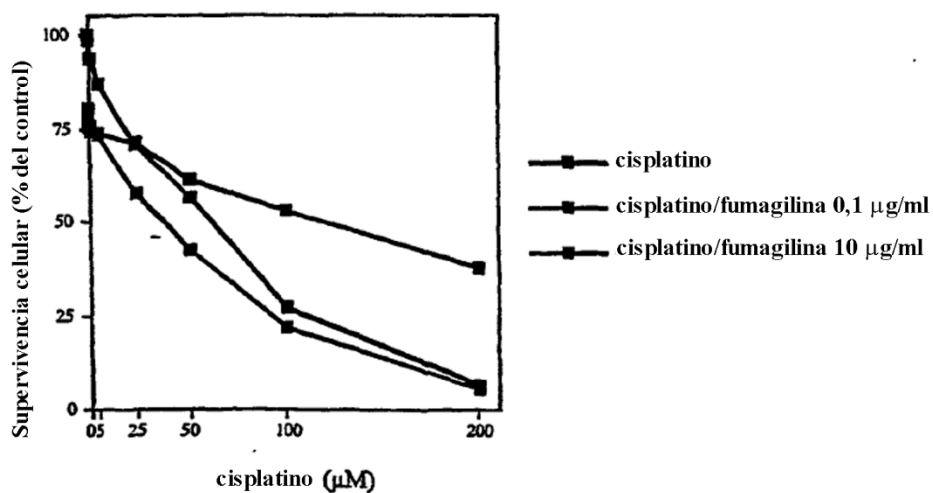
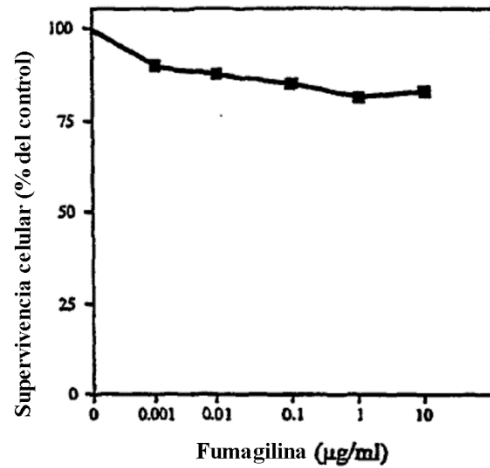


Figura 41

Supervivencia de células OVCA 429 tras 24 horas de exposición a fumagilina

(Todos los puntos mostrados son medias de dos experimentos independientes)



Supervivencia de células OVCA 429 tras 24 horas de exposición a cisplatino solo o combinaciones de cisplatino y fumagilina

(Todos los puntos mostrados son medias de dos experimentos independientes)

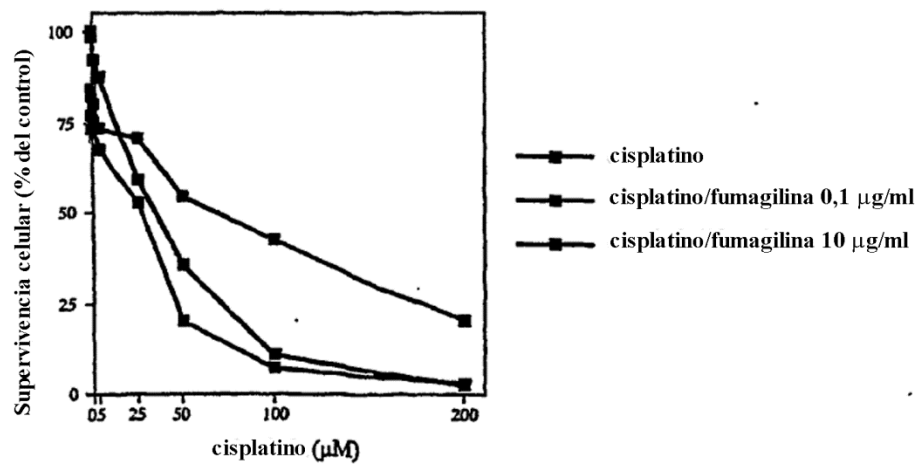


Figura 42

Silenciamiento del ARNm 39093

TAA

Secuencia diana #1	Secuencia diana #2	Secuencia diana #3
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

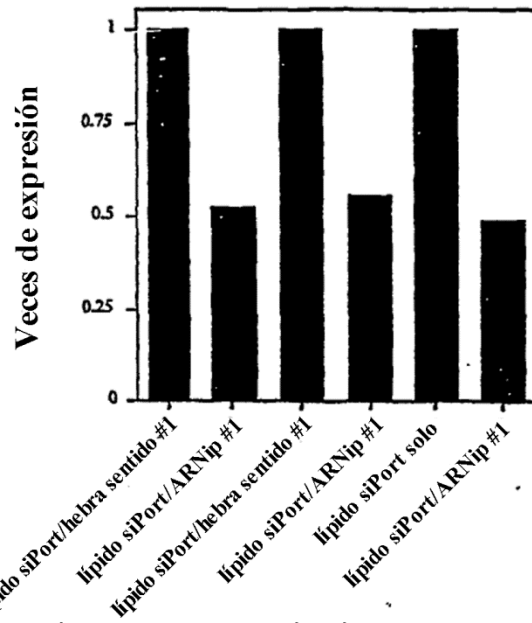
Secuencia diana del ARNm #1: AAA GAT CAG CAT TCG AAG ATA

Secuencia diana del ARNm #2: AAG CAC ATC GAC AAG TTA GAA

Secuencia diana del ARNm #3: AAA CAG TGC CGA TTG TGA AAG

Figura 43

Análisis por PCR en tiempo real cuantitativa de la expresión del ARNm 39093 en células OVCA 429 transfectadas con la hebra sentido #1 sola o con el ARNip #1



Análisis por PCR en tiempo real cuantitativa de la expresión del ARNm de GAPDH en células OVCA 429 tratadas con el lípido siPort solo o transfectadas con el ARNip #1 de 39093

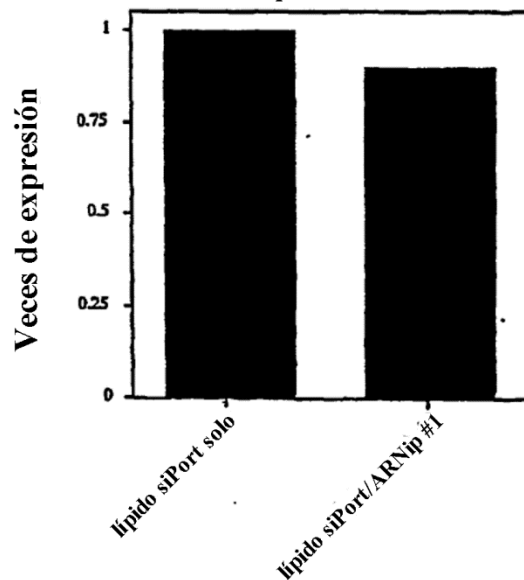


Figura 44

Efectos de cisplatino en células OVCA 429 transfectadas con el ARNip #1 de 39093

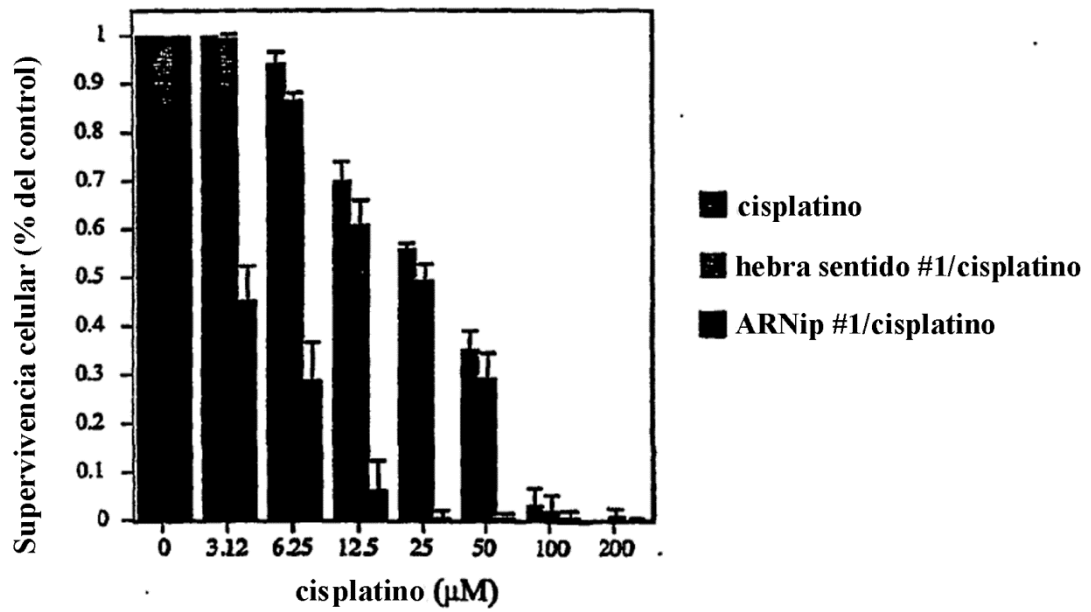


Figura 45

**Efectos de cisplatino en células OVCA 429
transfectadas con el ARNip #1 de 39093**

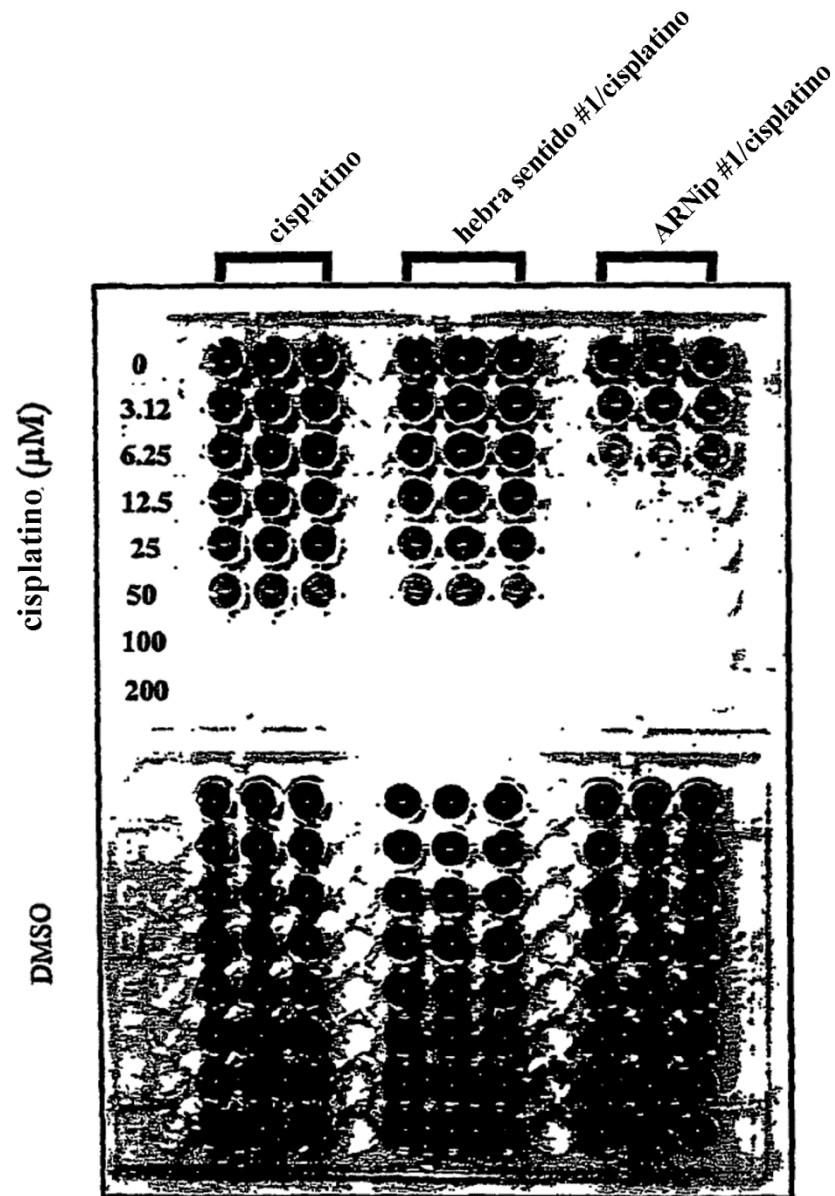


Figura 46

Silenciamiento del ARNm 250654

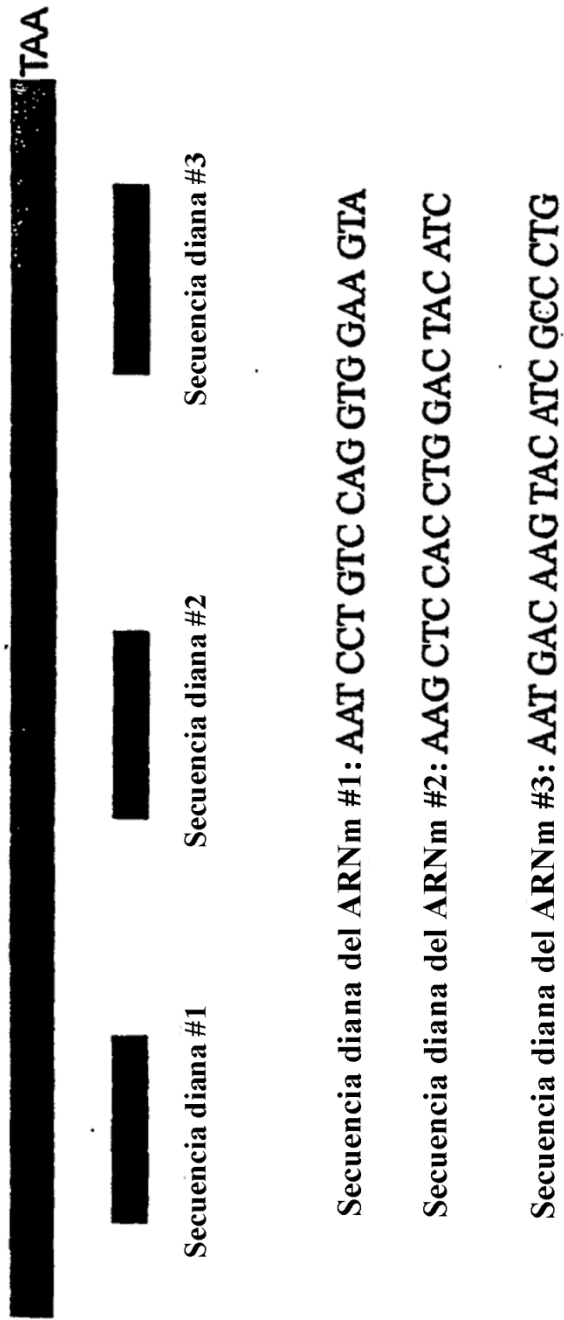


Figura 47

Análisis por PCR en tiempo real cuantitativa de la expresión del ARNm 250654 en células OVCA 429 transfectadas con diferentes ARNip y controles

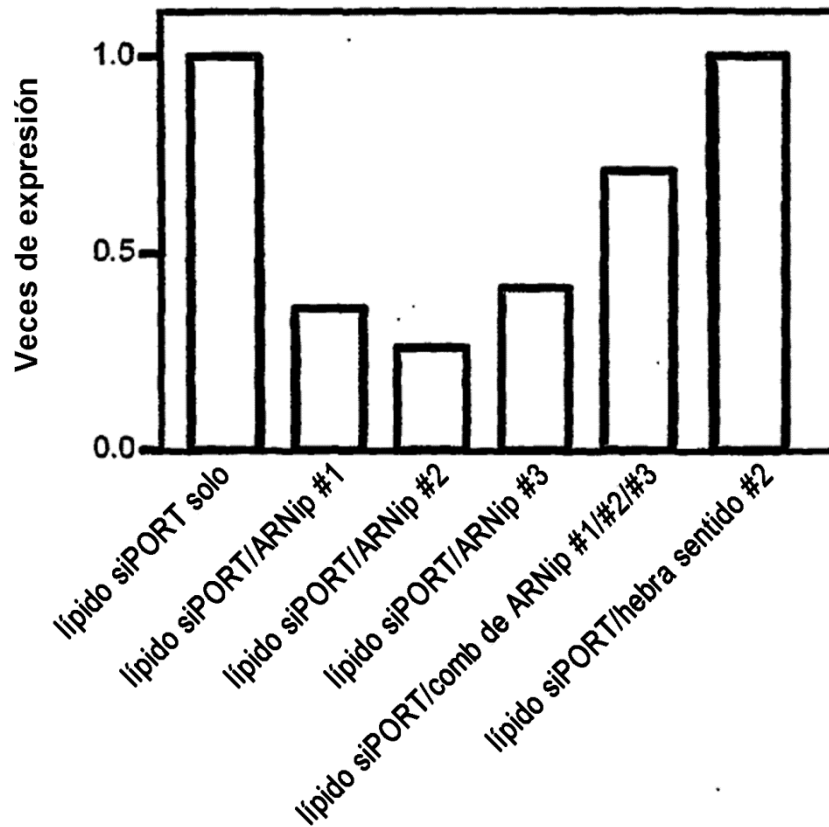
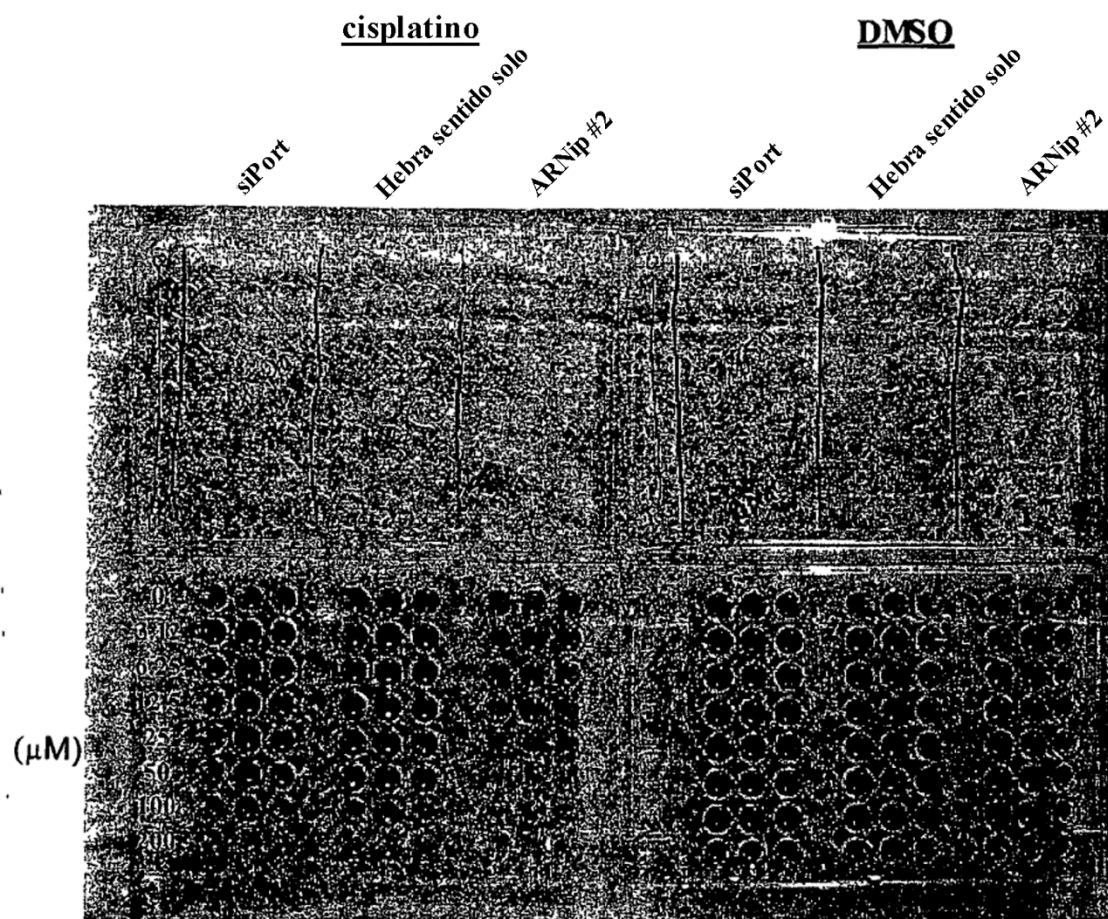


Figura 48

Figura 49



Efecto del silenciamiento mediado por ARNip de 250654 sobre la sensibilidad a cisplatino en OVCA 429

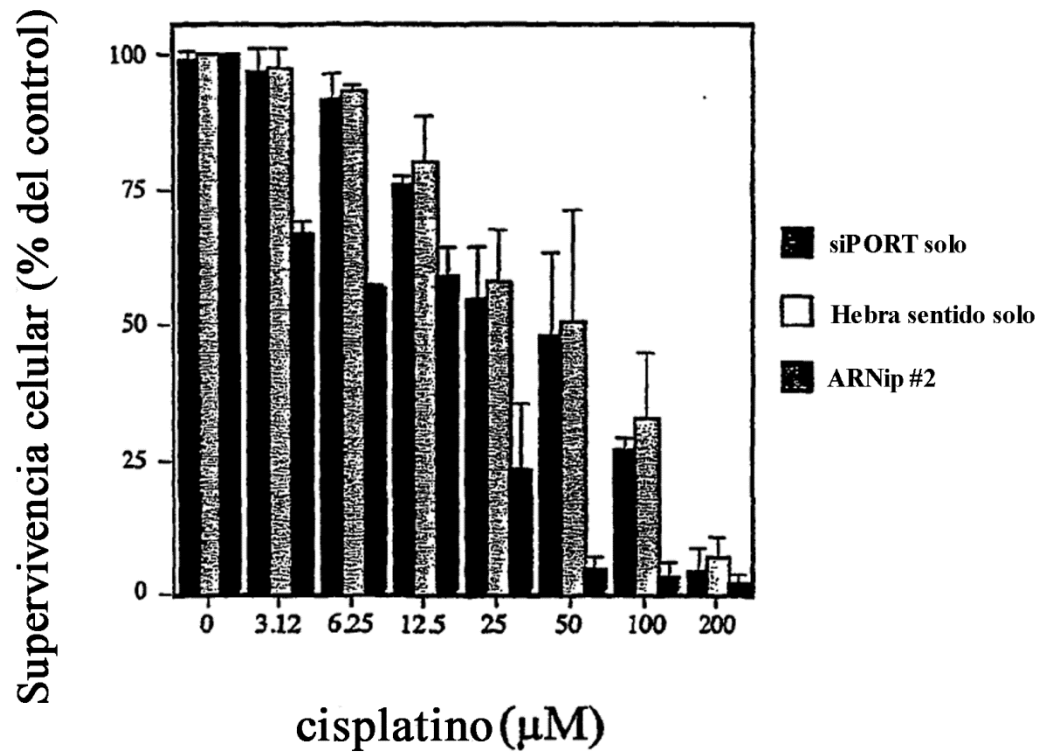


Figura 50

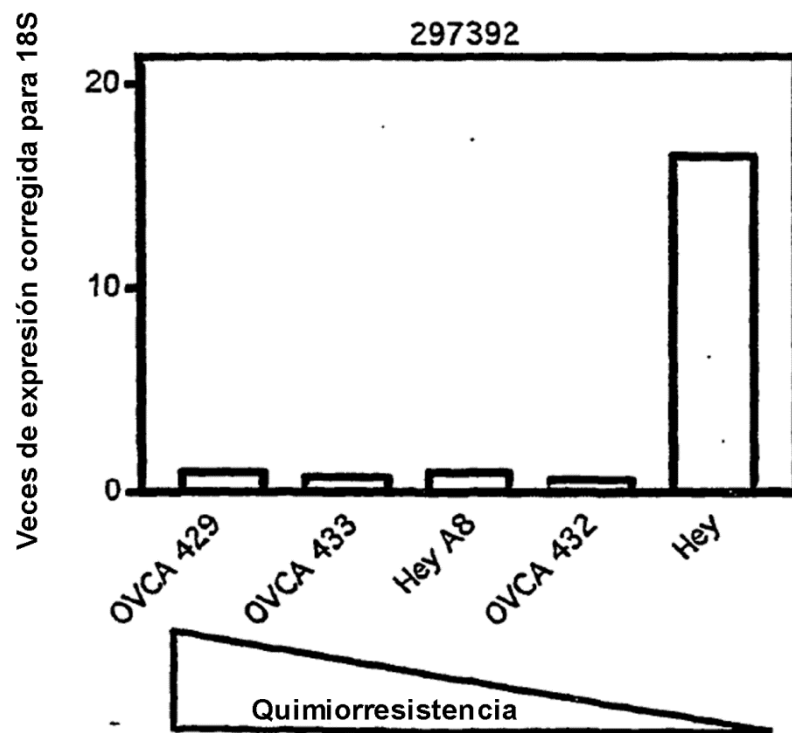


Figura 51

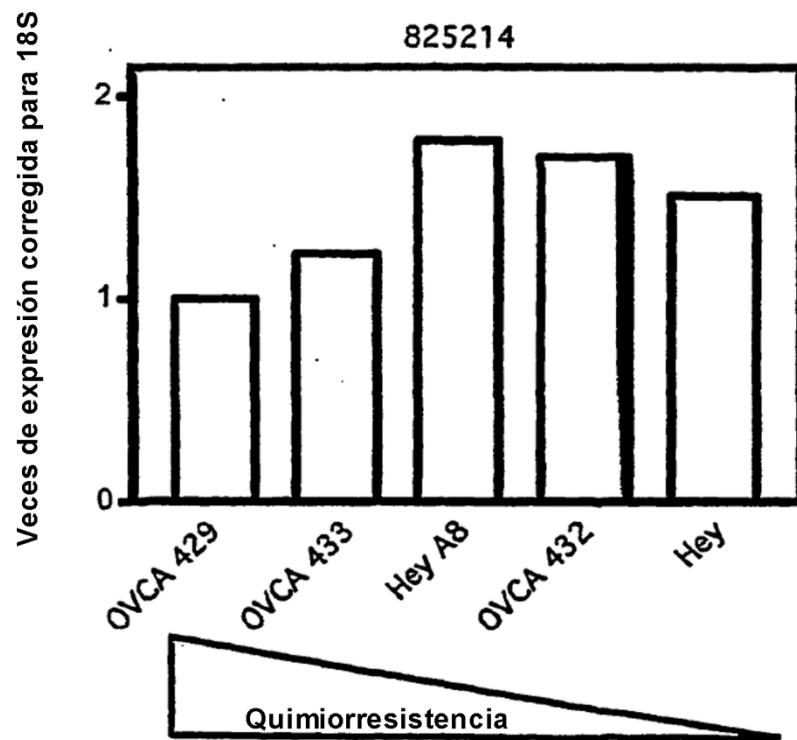


Figura 52

Silenciamiento de calpaína-2 en OVCA 429

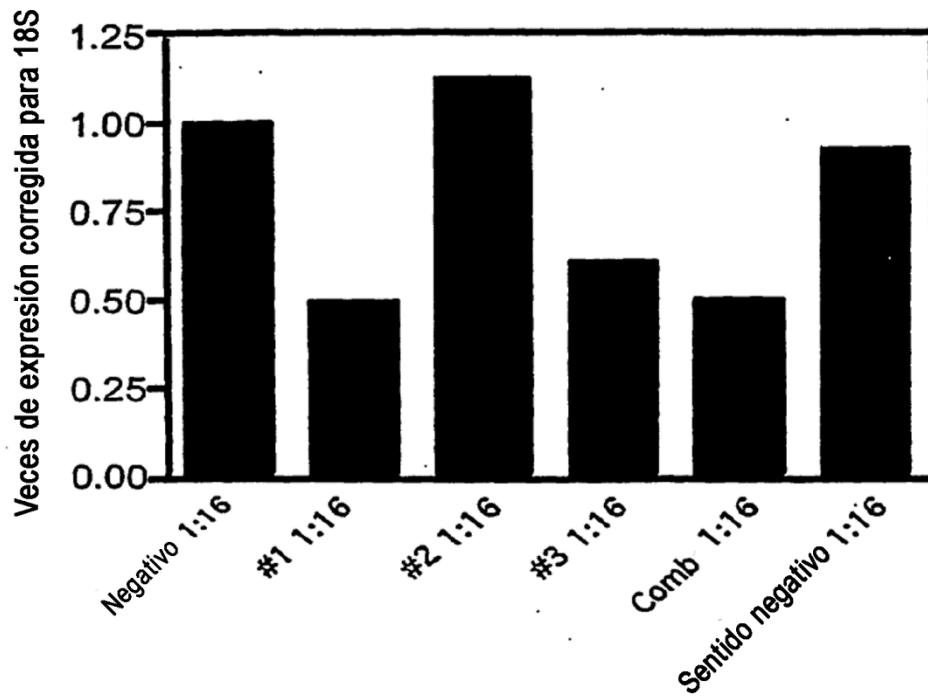


Figura 53

**Efectos de cisplatino en células OVCA 429 transfectadas
con un oligo no transcrito y el ARNip #3 generado contra
AF261089**

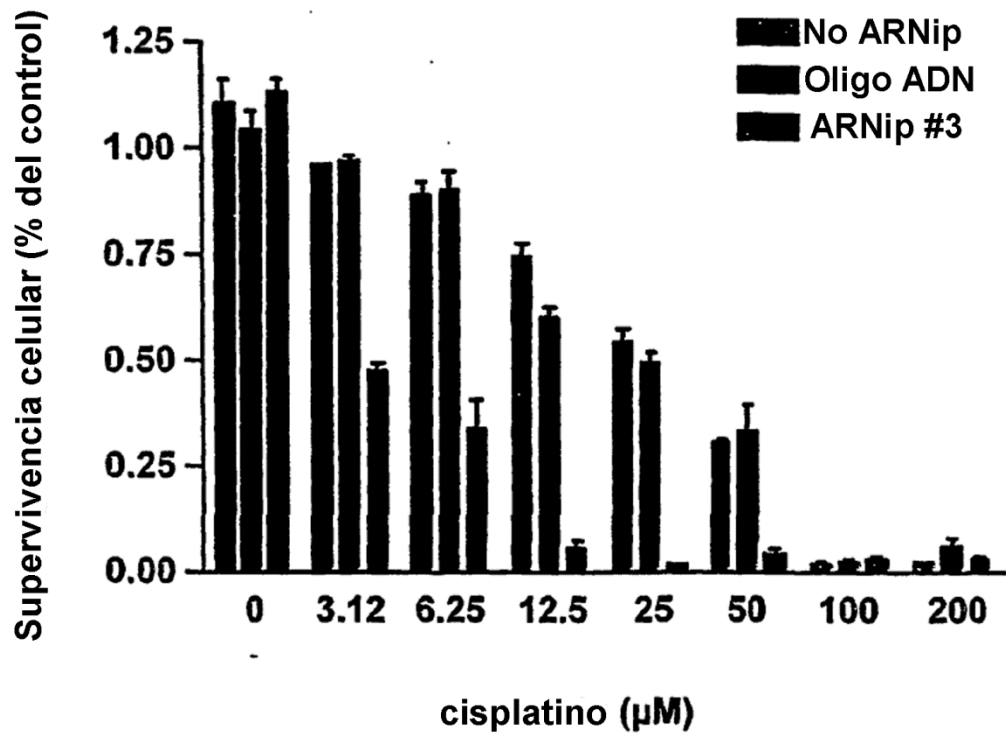


Figura 54

**Tratamiento de OVCA 429 con
inhibidor de calpaína I (ALLN)/cisplatino**

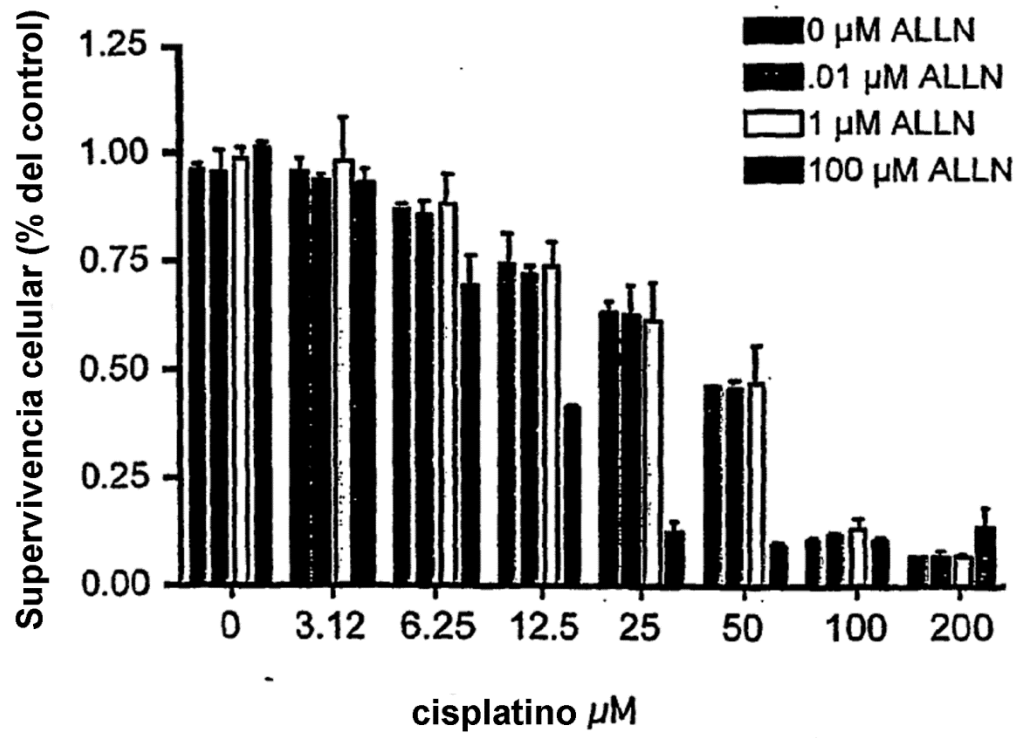


Figura 55

**Efectos de cisplatino en células OVCA 429
transfectadas con el ARNip #3 de BC015973**

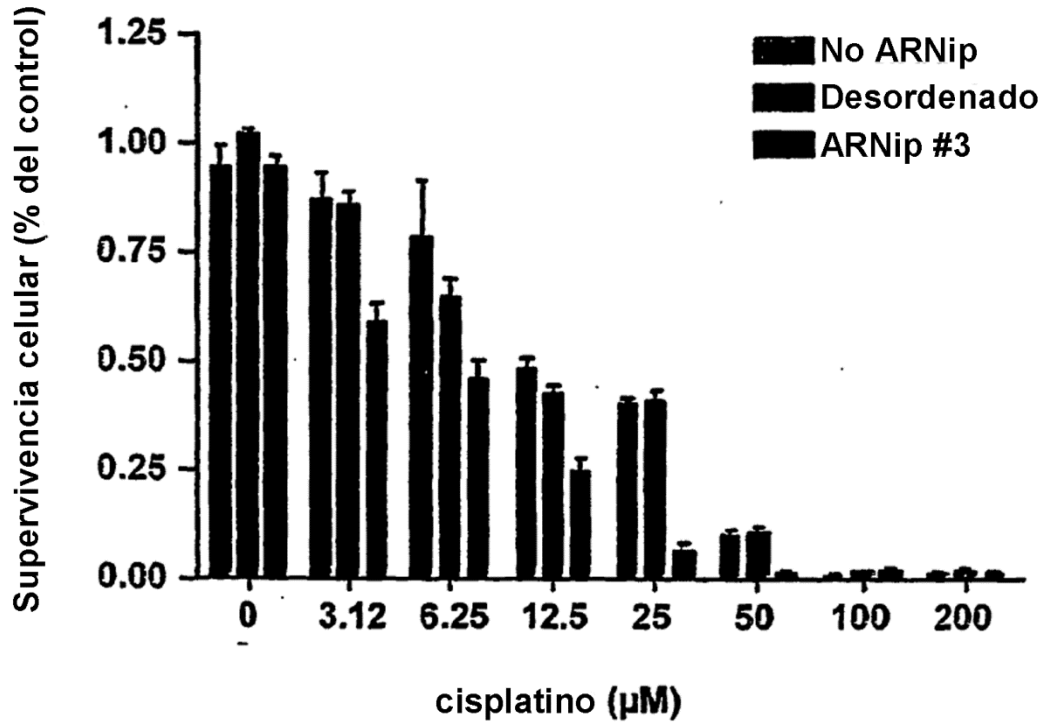


Figura 56

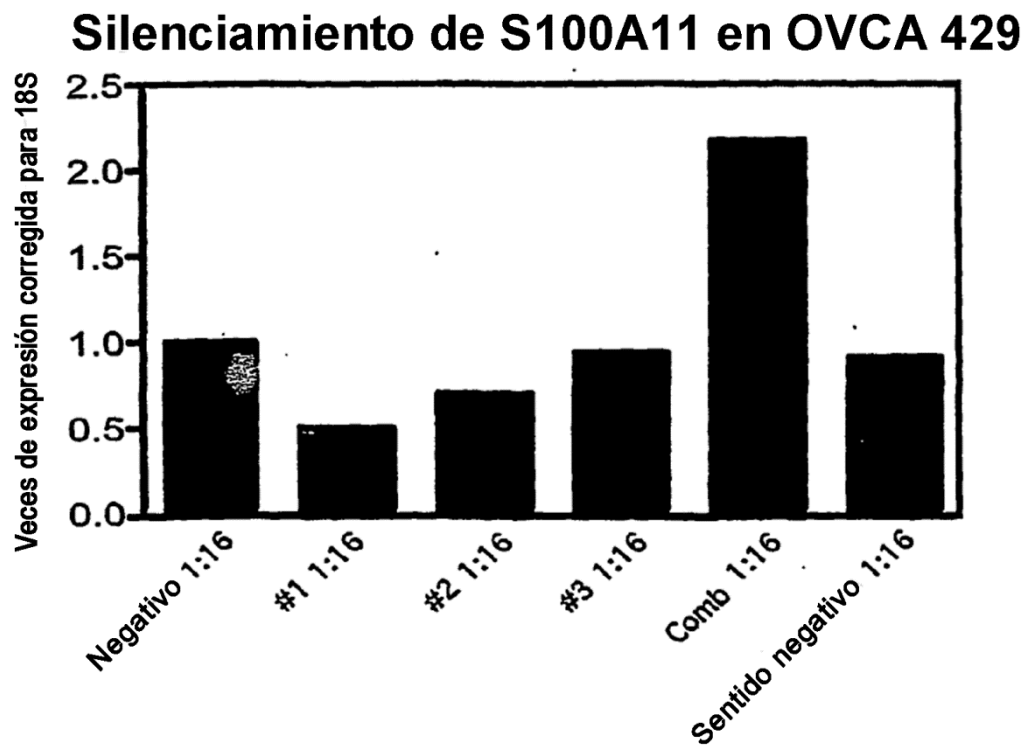


Figura 57

**Expresión de MetAP-2 en ADNc emparejados
de colon normal frente a tumoral**

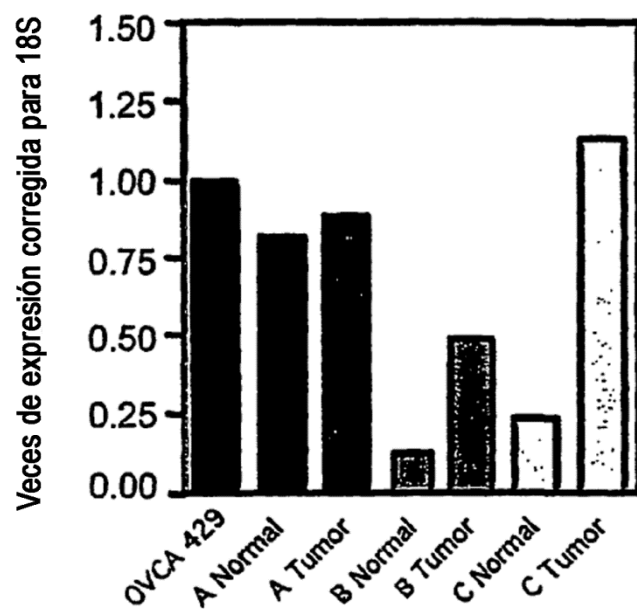


Figura 58

La expresión de 250654 (SPARC) en ADNc emparejados
de colon no tumoral frente a tumoral
(combinado de dos experimentos separados)

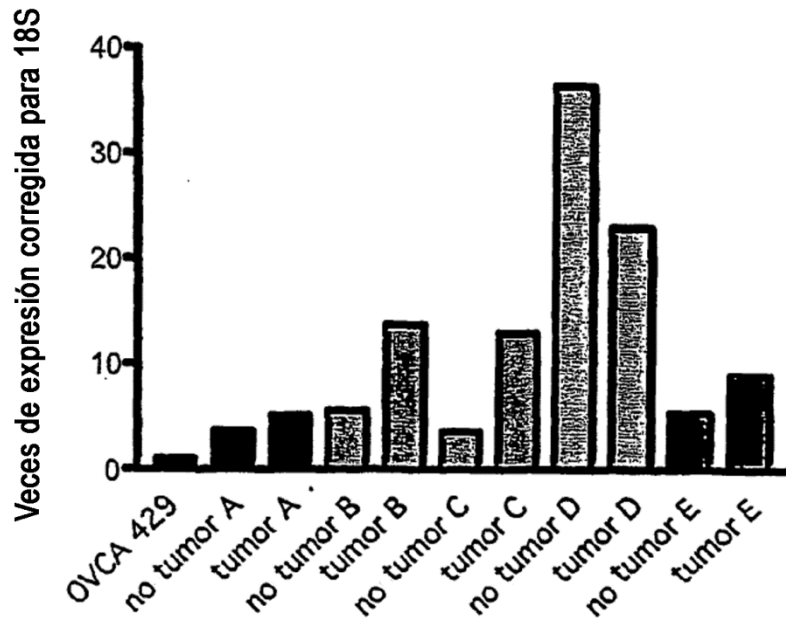


Figura 59

La expresión de 810612 (S100A11) en ADNc emparejados
de colon no tumoral frente a tumoral
(combinado de dos experimentos separados)

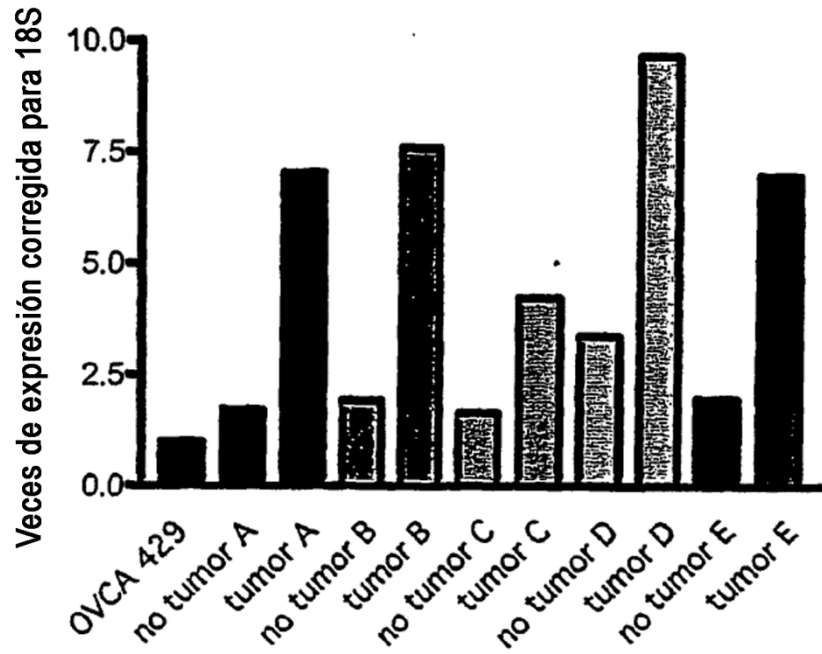


Figura 60

**Expresión del gen BC015973
en tejido de colon emparejado
(valor medio de carreras duplicadas para cada muestra)**

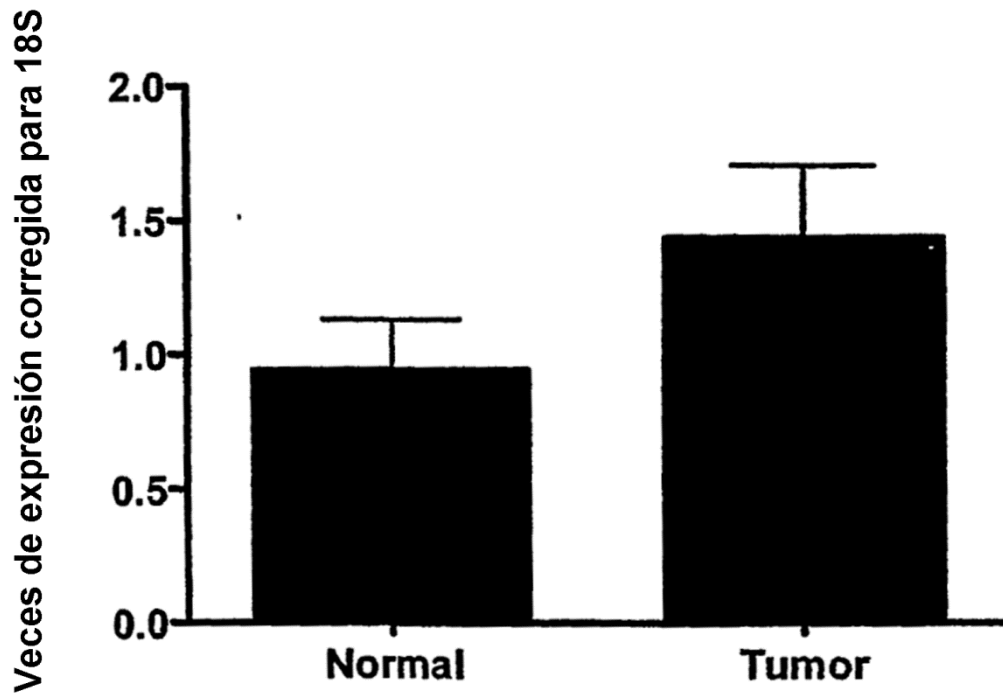


Figura 61

**Expresión del gen AF261089
en tejido de colon emparejado
(valor medio de carreras duplicadas para cada muestra)**

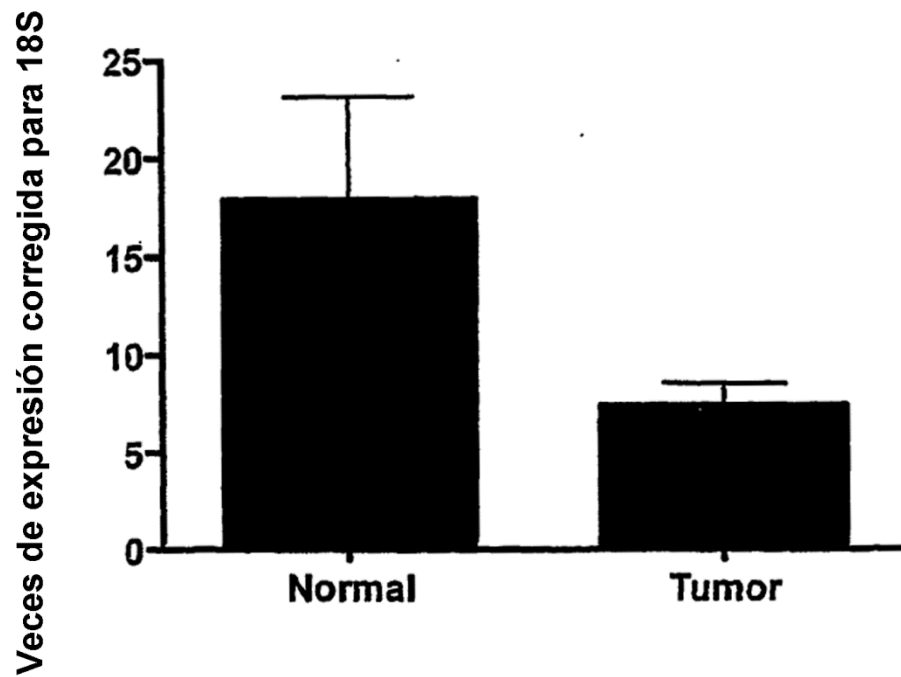


Figura 62

Volumen tumoral como función del peso corporal: Ratón #1
(sin tratar) frente al ratón #2 (tratado con cisplatino)

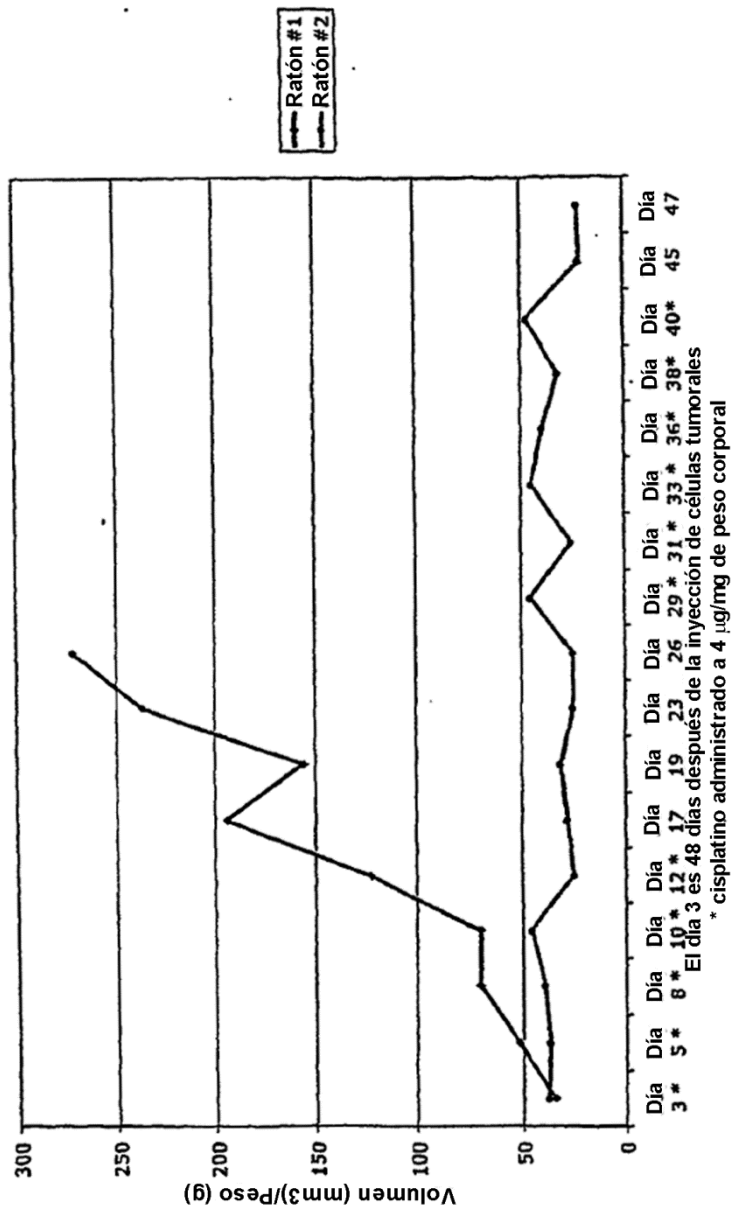
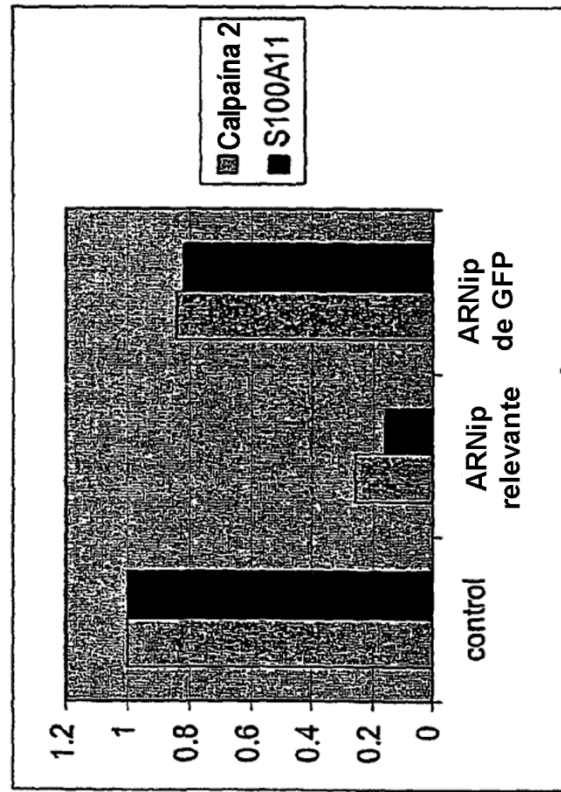


Figura 63

Medida de PCR en tiempo real de la expresión del ARNm del nivel de calpaína 2 o S100A11 en células OVCAR-3 con expresión estable de ARNip específicos contra calpaína 2 o S100A11



Control = células sin ARNip
 ARNip relevante = células con ARNip estable específico para calpaína 2 o S100A11
 ARNip de GFP = células estables con ARNip contra la proteína fluorescente verde como control irrelevante

Figura 64