

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 989**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2006 E 06814375 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 1937280**

54 Título: **Composiciones para la terapia de cánceres asociados con BCL2**

30 Prioridad:

12.09.2005 US 716134 P

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

03.12.2014

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
1524 North High Street
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

**CROCE, CARLO M. y
CALIN, GEORGE A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 523 989 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

Composiciones para la terapia de cánceres asociados con BCL2

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a productos génicos miR para su uso en el tratamiento del cáncer, en particular cánceres asociados con BCL2. La invención además engloba composiciones que comprenden al menos un agente anti-cáncer y al menos un producto génico miR.

10

Antecedente de la invención

Los microARN (miARN, miR) se encuentran en cientos de organismos distintos, incluyendo las moscas de la fruta, nematodos y humanos. Se cree que los miARN están implicados en varios procesos que modulan el desarrollo de estos organismos. Los miARN se procesan a partir de estructuras plegadas de ARN precursor de 60 a 70 nucleótidos, que se transcriben a partir del gen miARN. El ARN precursor y los productos procesados miARN se detectan fácilmente, y una falta de estas moléculas puede indicar una eliminación o pérdida de función del correspondiente gen miARN.

15

20

Los cánceres son una causa significativa de mortalidad y morbilidad en los EE. UU. y por todo el mundo. En particular la leucemia linfocítica crónica ("CLL") y otros cánceres asociados a BCL2 (por ejemplo, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, melanomas, linfomas (por ejemplo, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma no Hodgkin), carcinomas (por ejemplo, carcinoma cerebral, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular y carcinoma gástrico), enfermedades hematológicas malignas, tumores sólidos, cáncer colorrectal, enfermedad linfoproliferativa asociada al virus de Epstein-Barr) son enfermedades neoplásicas clínicamente importantes en los seres humanos adultos. Por ejemplo, la CLL es la forma más común de leucemia en adultos en el mundo occidental, y la incidencia del cáncer de próstata ajustada por edad sobrepasa ahora a todos los otros cánceres entre los hombres en los Estados Unidos, y, tras el cáncer de pulmón, es la segunda causa principal de todas las muertes masculinas por cáncer en el país.

25

30

Se produce una pérdida hemocigota y/o homocigota en 13q14 en más de la mitad de los casos de CLL comunicados, y constituye la anomalía cromosómica más frecuente en la CLL. El cariotipado de las muestras de tejido de pacientes con CLL identificaban relativamente pocas anomalías cromosómicas, sugiriendo que la especificidad y la frecuencia de las eliminaciones observadas en 13q14 tenían una significación patológica. Además, las eliminaciones de 13q14 también se producen en el 60 % de los cánceres de próstata, sugiriendo que están implicados uno o más genes supresores tumorales que se localizan en 13q14 en la patogénesis de ambos cánceres prostático y CLL.

35

40

La presencia de ambas eliminaciones clónicas homocigota y heterocigota, y la frecuencia de pérdida tan alta en los cánceres de próstata y CLL, indican que las eliminaciones en esta región están relacionadas con la etiología de ciertos tipos de cáncer. Varios grupos han utilizado la clonación posicional con el fin de identificar el gen o genes de las áreas eliminadas. Hasta la fecha, se han identificado un total de ocho genes en las regiones eliminadas de 13q14 en casos esporádicos y en casos familiares de CLL y se han explorado alteraciones a nivel de ADN y/o ARN: *Leu1* (*BCMS* o *EST70/Leu1*), *Leu2* (*ALT1* o *1B4/Leu2*), *Leu5* (*CAR*), *CLLD6*, *KPNA3*, *CLLD7*, *LOC51131* (supuesto antígeno de proteína dedo de zinc NY-REN-34) y *CLLD8*. Sin embargo, los análisis genéticos detallados, incluidos los estudios de pérdida extensa de heterocigosidad (LOH), mutación y expresión, no han podido demostrar una implicación consistente de cualquiera de estos genes en la carcinogénesis.

45

50

Los linfocitos B malignos, generalmente no divididos de CLL sobre-expresan la proteína Bcl2 (Kitada, S., y col., *Blood* 91: 3379-3389 (1998)), un inhibidor de apoptosis que tiene un papel principal en la promoción de la supervivencia de las células eucariotas inhibiendo la muerte celular (Cory, S., y Adams, J.M., *Nature Reviews* 2: 647-656 (2002)). La sobre-expresión de Bcl-2 se ha asociado con muchos tipos de cánceres humanos, incluyendo las leucemias y los carcinomas (Sanchez-Beato, M., y col, *Blood* 101: 1220-1235 (2003)). En los linfomas foliculares, y en una fracción de los linfomas difusos de células B, se descubrió que el mecanismo de la activación de BCL2 es una translocación cromosómica, t(14;18)(q32;q21), que sitúa el gen BCL2 bajo el control de potenciadores de cadena pesada de inmunoglobulinas, lo que da como resultado la expresión no regulada del gen (Tsujiyama, Y., y col, *Science* 226: 1097-1099 (1984); Tsujiyama, Y., y col, *Science* 228: 1440-1443 (1985)). Sin embargo, el gen BCL2 está yuxtapuesto a los loci inmunoglobulina en menos del 5 % de los casos de CLL (Adachi, M., y col, *J. Exp. Med.* 171: 559-564 (1990)), y se desconoce el mecanismo por el que se sobre-expresa BCL2 en la mayoría de los cánceres CLL.

55

60

Las terapias actuales de CLL implican normalmente la quimioterapia, administrada sola o en combinación con un trasplante autólogo de médula ósea. Los agentes quimioterápicos que se emplean en general son tóxicos para el paciente y producen solamente remisiones parciales o una proporción relativamente grande de los pacientes. Las terapias para el tratamiento del cáncer asociado con BCL2 también pueden implicar la quimioterapia, a menudo a continuación de la resección quirúrgica del tumor. Sin embargo, en la CLL, las propiedades curativas de los agentes

65

quimioterápicos (con o sin cirugía) son limitadas.

El tratamiento con quimioterapia sola está limitada porque las células cancerosas a menudo se vuelven resistentes a un amplio espectro de agentes quimioterápicos no relacionados estructuralmente. Tal resistencia, denominada "resistencia multifármaco" (MDR), es un problema común en el tratamiento de pacientes con cáncer, y la resistencia de las células tumorales a los fármacos quimioterápicos representa un problema importante en oncología clínica.

La apoptosis es un componente importante de la secuencia de acontecimientos durante los cuales los fármacos quimioterápicos inducen una respuesta antitumoral, y los estudios han implicado a Bcl2 como que tiene un papel crítico en la apoptosis inducida por los fármacos anti-cáncer (Kim, R y col, Cancer 101(11): 2491-2502 (2004)). Además, las células tumorales modificadas que sobre-expresan Bcl2 desarrollan resistencia a los efectos citotóxicos de varios fármacos diferentes (Kamesaki y col., Cancer Res. 53: 4251-4256 (1993); Miyashita y Reed, Blood 81: 151-157 (1993)).

El documento US 2005/176025 describe compuestos, composiciones y métodos útiles para la modulación de la expresión génica de BCL2 y/o su actividad utilizando moléculas de ácido nucleico corto de interferencia (ANsi) o por ARN de interferencia (ARNi) utilizando moléculas pequeñas de ácido nucleico. En particular, el documento US 2005/176025 muestra moléculas pequeñas de ácido nucleico, tales como ANsi, ARN corto de interferencia ARNsi, ARN de cadena doble (ARNds), micro-ARN (miARN), y moléculas cortas de ARN en horquilla (ARNsh) y métodos utilizados para modular la expresión de los genes BCL2.

Además el documento US '025 sugiere que las moléculas pequeñas de ácido nucleico pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer, enfermedad de la sangre maligna, policitemia vera, mielofibrosis idiopática, trombocitemia esencial, síndromes mielodisplásicos, enfermedades autoinmunes, infección vírica, y enfermedades y afecciones proliferativas.

El documento WO 2004/043387 desvela que los genes de microARN miR15 y el miR16 se localizan en 13q14 con una región de pérdida de 30 kb característica de las células de ciertos cánceres, tales como las células de la leucemia linfocítica crónica o el cáncer de próstata. Además, el documento WO '387 sugiere que la leucemia linfocítica crónica y el cáncer de próstata se pueden diagnosticar detectando una reducción del número de copias del gen miR15 o miR16, determinando un estado de mutación génica de miR15 o miR16, o detectando una reducción en el ARN transcrito por estos genes, y que los productos génicos miR15 o miR16 pueden inhibir el crecimiento neoplásico o tumorigénico de cánceres tales como la leucemia linfocítica crónica o las células del cáncer de próstata cuando se administran a sujetos que padecen estas enfermedades.

El documento WO 2005/078139 desvela que los genes de microARN se asocian fuertemente con características cromosómicas que están implicadas en la etiología de diferentes cánceres y que se puede utilizar la evaluación de la expresión génica de miR para indicar la presencia de un cáncer que produce una lesión cromosómica en un sujeto. Además el documento WO '139 desvela que el cambio en el nivel de expresión génica de miR que se produce por una característica cromosómica asociada al cáncer también puede contribuir a la cancerogénesis, un cáncer determinado se puede tratar restaurando el nivel de expresión génica del miR al normal.

Existe una necesidad de un ensayo diagnóstico rápido, económico y preciso para la CLL y otros cánceres asociados a BCL2. También existe la necesidad de un tratamiento económico y eficaz para los cánceres asociados a BCL2, tales como CLL, que no tengan un impacto negativo en el paciente. Existe además una necesidad de nuevas terapias contra el cáncer que se dirijan a inhibir la expresión de Bcl2, debido a que una amplia variedad de cánceres comunes se asocian con la sobre-expresión de la proteína Bcl2. Además, existe la necesidad de terapias contra el cáncer mejoradas que muestren un aumento de eficacia respecto a otras terapias convencionales contra el cáncer. Además, existe la necesidad de identificar los agentes y métodos que puedan aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a los efectos citotóxicos de los agentes contra el cáncer, mejorando de esta manera las terapias contra el cáncer. Existe también una necesidad de métodos para inducir apoptosis en una célula que sobre-exprese una proteína anti-apoptótica, tal como la Bcl2.

Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto que ciertos microARN con secuencias que son complementarias a las secuencias de nucleótidos de la transcripción del gen BCL2 no están reguladas en las células cancerosas que sobre-expresan la proteína Bcl2.

En consecuencia, la invención proporciona productos génicos miR que comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de la transcripción del gen BCL2 y que es miR-15a o miR-16-1 para su uso en el tratamiento del cáncer reduciendo la expresión de dicha transcripción del gen BCL2 en un sujeto que tiene un cáncer asociado con BCL2 en donde se sobre-expresa BCL2, en donde el sujeto está recibiendo al menos un tratamiento contra el cáncer y en donde, se aumenta la eficacia del tratamiento contra el cáncer. La invención también proporciona productos génicos miR que comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción del gen BCL2 y que es miR-15a o miR-16-1

para su uso en el tratamiento del cáncer reduciendo la expresión de dicha transcripción del gen BCL2 en un sujeto que tiene un cáncer asociado con BCL2 en el que se sobre-expresa BCL2, en donde se induce apoptosis en una célula cancerosa presente en el sujeto, cuya célula cancerosa se pone en contacto con el producto génico miR. Como se utiliza en el presente documento el término "BCL2" se refiere a un ácido nucleico BCL2 (por ejemplo, un gen BCL2, ADNc, transcripción ARN, construcción de ADN), mientras que "Bcl2" se refiere a un producto proteico. En una realización particular, el al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741 a 3749 de la SEC ID N° 55. Los genes miR15 y miR16 se localizan en 13q14 y comúnmente se denominan mir15a y miR-16-1, respectivamente. Como se utiliza en el presente documento los términos "miR15" y "miR-15a" son intercambiables, al igual que los términos "miR16" y "miR-16-1".

La invención proporciona además una composición farmacéutica para tratar un sujeto que tiene un cáncer asociado con la sobre-expresión de Bcl2, que comprende al menos un agente anti-cáncer y al menos un producto génico miR, en donde el al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción del gen BCL2 y que es miR-15a o miR-16-1 para su uso en el tratamiento del cáncer reduciendo la expresión de dicha transcripción génica BCL2 en un sujeto que tiene un cáncer asociado con BCL2 en el que se sobre-expresa BCL2, y en el que se aumenta la sensibilidad de las células cancerosas al agente anti-cáncer por medio del producto génico miR.

También se desvelan en el presente documento métodos para prevenir un cáncer o tratar un cáncer asociado con la sobre-expresión de un gen BCL2 o un producto génico (por ejemplo, ARN, proteína) en un sujeto que tiene necesidad de tal tratamiento, que comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos un producto génico miR.

También se desvela en el presente documento un método para determinar la eficacia de la terapia contra el cáncer en un sujeto que tiene un cáncer asociado con BCL2, que comprende la administración de al menos un agente al sujeto, y posteriormente midiendo la expresión de un producto génico miR que comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una transcripción génica BCL2. Un aumento de la expresión del producto génico miR puede ser de miR-15a. El al menos un producto génico miR puede ser miR-16-1. El al menos un producto génico miR puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, miR-186, y combinaciones de los mismos. El producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195 y combinaciones de los mismos. El producto génico miR puede no ser miR-15a o miR-16-1. También se desvelan en el presente documento métodos para aumentar la eficacia de tratamientos contra el cáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia) que comprenden proporcionar al menos un producto génico miR a una célula tumoral, en combinación con al menos un tratamiento contra el cáncer. El al menos un producto génico miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de la transcripción génica BCL2. El al menos un producto génico miR puede ser miR-15a o miR-16-1. El al menos un producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, miR-186, y combinaciones de los mismos. El producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195 y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el producto génico miR no es miR-15a o miR-16-1.

También se desvelan en el presente documento métodos para aumentar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia) que comprende proporcionar al menos un producto génico miR a una célula tumoral, en combinación con al menos un tratamiento anti-cáncer. El al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. El al menos un producto génico miR puede ser miR-15a o miR-16-1. El al menos un producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, miR-186, y combinaciones de los mismos. El producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195 y combinaciones de los mismos. El producto génico miR puede no ser miR-15a o miR-16-1.

También se desvela en el presente documento un método para aumentar la sensibilidad de una célula cancerosa a los efectos citotóxicos de un agente anti-cáncer, que comprende proporcionar al menos un producto génico miR a una célula cancerosa, en donde el al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de la transcripción génica BCL2. El al menos un producto génico miR puede ser miR-15a o miR-16-1. El al menos un producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, miR-186, y combinaciones de los mismos. El producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195 y combinaciones de los

mismos. El producto génico miR puede no ser miR-15a o miR-16-1. El agente anti-cáncer puede ser un agente quimioterápico. El agente anti-cáncer puede ser un tratamiento por radiación.

5 También se desvelan en el presente documento métodos de inducción de apoptosis de una célula, que comprende poner en contacto una célula con al menos un producto génico miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. El producto génico miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID N° 55. El al menos un producto génico miR puede ser miR-15a o miR-16-1. El al menos un producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, miR-186, y combinaciones de los mismos. El producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195 y combinaciones de los mismos. El producto génico miR puede no ser miR-15a o miR-16-1. Las células adecuadas para estos métodos incluyen, pero sin limitarse a estas, células cancerosas y otras células que expresan la proteína Bcl2.

10 También se desvela en el presente documento un método para diagnosticar un cáncer asociado con BCL2 en un sujeto, que comprende la determinación del nivel de al menos un producto génico miR en una muestra del sujeto, con respecto al nivel de un producto génico miR correspondiente en una muestra control, en donde el producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de la transcripción génica BCL2.

15 El producto génico miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID N° 55. El al menos un producto génico miR puede ser miR-15a o miR-16-1. El al menos un producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, miR-186, y combinaciones de los mismos. El producto génico miR se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195 y combinaciones de los mismos. El producto génico miR puede no ser miR-15a o miR-16-1.

Breve descripción de los dibujos

20 La patente o solicitud registrada contiene al menos un dibujo en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos en color se proporcionará en la Oficina bajo pedido y pago de la tasa necesaria.

25 Las FIG. 1A y 1B son representaciones esquemáticas de la estructura secundaria prevista del ARN precursor de miR15 y miR16, respectivamente. La predicción de la estructura secundaria de ARN se llevó a cabo utilizando el programa "mfold", versión 3.1 de Matthews, y col., J. Mol. Biol. 288:911-940 (1999), y se refinó manualmente para acomodar los pares de bases oscilantes G/U en los segmentos helicoidales. La secuencia de los miR15 y miR16 procesados está subrayada. Adaptado de Lagos-Quintana, y col., Science 294:853-858 (2001).

30 La FIG. 2A es un mapa de genes del locus supresor de tumores 13q14 en la CLL que muestra la localización del agrupamiento génico miR15/16. Se muestra la posición de los marcadores génicos y los genes en el mapa.

35 La FIG. 2B es un mapa de las eliminaciones en 13q14 mencionadas anteriormente, marcadas por los recuadros con rayas horizontales.

40 La FIG. 2C es un mapa del locus entre los marcadores *D13S1150* y *D13S272*. La orientación de cada gen en este locus se marca con una flecha bajo el nombre del gen, y las barras verticales marcan la posición de los exones correspondientes para cada gen.

45 La FIG. 2D es un mapa del locus entre los marcadores Alu 18 y *D13S272*. Las barras y recuadros marcan la posición de los exones para *LEU2/ALT1* y *LEU1*. Las flechas verticales cortas marcan la posición de los genes *miR15* y *miR16*. Los círculos marcan la posición de los cebadores de PCR utilizados para seleccionar los clones híbridos de células somáticas derivadas de una fusión de dos casos independientes de leucemia (CCL-A y CLL-B). Los recuadros sombreados representan porciones del cromosoma 13 presentes en los híbridos. "←-31,4 kb→" indica una región eliminada de aproximadamente 31,4 kb en el clon CCL-A, que se deriva de un paciente con CLL que portaba una translocación t(2; 13)(q12; q13), retinoblastoma bilateral, y colitis ulcerativa. La flecha vertical larga representa la posición de punto de rotura en el clon CCL-B que porta la translocación t(2; 13)(q32; q14), y "←-29 kb→" indica una región eliminada de aproximadamente 29 kb en este clon CLL.

50 La FIG. 3A es un análisis de transferencia de Northern de la expresión génica de *miR15* y *miR16* en células normales de riñón humano, próstata, hígado, páncreas, músculo esquelético ("músculo Esq."), testículos, linfocitos B CD5+ (CD5+), células de leucemia ("Per B1 leuk"), y médula ósea ("MO").

55 La FIG. 3B es un análisis de pérdida de heterocigosidad ("LOH") de microsatélites marcadores *D13S272* y *D13S273* en 18 pacientes de CLL. Se usó como control el ADN de células CD5+ humanas normales. El estado de LOH en las muestras se muestra como "+/+", "+/-", "-/-", "NI" (no informativo), "?" (material no suficiente) y "ND" (no hecho). Se utilizaron geles Northern teñidos con bromuro de etidio como controles de normalización.

60 La FIG. 4A representa las regiones de complementariedad miR::ARNm (nucleótidos rojos) entre los miARN humanos, *miR-15a* (Hsa_miR-15; SEC ID N° 58) o *miR-16-1* (Hsa_miR-16; SEC ID N° 59), y ADNc BCL2 humano

(Hsa_BCL2; SEC ID Nº 57), así como miARN de ratón, *miR-15a* (Mmu_miR-15; SEC ID Nº 61) o *miR-16-1* (Mmu_miR-16; SEC ID Nº 62), y ADNc BCL2 de ratón (Mmu_BCL2; SEC ID Nº 60). Los sitios de las eliminaciones dirigidas en miR-15a y miR-16-1 están indicadas por dos construcciones diferentes mutantes 3'UTR: 3'M1, que carece de todas la 9 pb responsables de la interacción miARN::ARNm, y 3'M2, que carece de las primeras 5 pb en la región de complementariedad.

La FIG. 4B es una transferencia de Western que representa los niveles de proteína Bcl2 en cada una de las 5 muestras diferentes de CLL (CLL), así como una muestra agrupada de linfocitos B positivos a CD5 de pacientes normales (grupo CD5). Se utilizaron células Jurkat (línea celular de linfocitos T de leucemia) como células de control para la expresión de proteína Bcl2. Se utilizaron los niveles de β -actina (Actina) para la normalización. Se determinó la expresión relativa de cada miARN miR-15a y miR-16-1 de cada muestra por intensidad de señal en micromatriz, y se muestra debajo de la calle correspondiente bajo la transferencia.

La FIG. 5A son transferencias de Western que representan los niveles de proteína Bcl2, así como las formas de longitud completa y escindida de varios activadores de apoptosis (por ejemplo, APAF1, Pro-C9, C9, PARP y PARP escindido), en las células MEG-01 sin transfectar (MEG-01 WT), así como en células MEG-01 transfectadas con el vector vacío (MEG-01-pRS-neo-GFP), las células MEG-01 transfectadas con el vector que contiene el agrupamiento mir-15a/miR-16-1 (MEG-01-pRS-15a/16-1 WT), o las células MEG-01 transfectadas con un vector que contiene el agrupamiento mir-15a/miR-16-1 que tiene una sustitución +7 (C por T) en la región 3' del precursor del miR-16 a (MEG-01-pRS-15a/16-1 MUT). Los datos se confirmaron en experimentos por duplicado. Las células transfectadas con el pRS-15a/16-1 WT mostraban una escisión de APAF1 (factor activador de proteasa apoptótica 1, que interactúa con el citocromo C), pro-caspasa 9 (ruta intrínseca de apoptosis) y poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP, un efector final de varias rutas apoptóticas). Se controló la Actina como control de carga.

La FIG. 5B son transferencias de Western (TW) que representan niveles de proteína Bcl2 en células MEG-01 transfectadas con oligonucleótidos ARN miR-15a y/o miR-16-1 en sentido (miR-15a, miR-16-1), o miR-15a y/o miR-16-1 antisentido (miR-15a_AS, miR-16-1_AS). Se utilizaron las células sin transfectar como control (MEG-01 WT). Se llevó a cabo la normalización utilizando los niveles de beta-actina (Actina). Se llevaron a cabo transferencias Northern (TN) para evaluar la eficacia de la transfección de oligonucleótidos miR-15 en sentido y miR-16 en sentido. Los productos de la RT-PCR representan los niveles de ARNm de las transcripciones BCL2 en las mismas células, que están normalizadas contra los niveles de ARNm de beta-actina (Actina) (RT-PCR).

La FIG. 6A es un gráfico de barras que representa la represión relativa (en veces de represión) de la expresión de luciferasa de luciérnaga, en referencia a la expresión de un control de transfección de luciferasa de renilla, en las células transfectadas con oligonucleótidos ARN miR-15-a y/o miR-16-1 en sentido (miR15a S y miR-16-1 S, respectivamente), u oligonucleótidos ARN miR-15-a y/o miR-16-1 antisentido (miR15a A y miR-16-1 A, respectivamente). Las células se transfectaron con el vector control vacío (pGL-3-Cont) o con oligonucleótidos ARN miR-15-a y/o miR-16-1 en sentido o antisentido. Todos los experimentos se llevaron a cabo dos veces por triplicado (n = 6).

La FIG. 6B es un gráfico de barras que representa la represión relativa de la expresión de la luciferasa de luciérnaga, referenciada a un control de transfección de luciferasa de renilla. Las células se transfectaron con un vector control vacío (pGL-3-Cont), oligonucleótidos ARN *miR-15-a* y *miR-16-1* en sentido (pSR-15a/16-1 S +3'UTR) u oligonucleótidos ARN *miR-15-a* y *miR-16-1* antisentido (pSR-15a/16-1A+3'UTR). La 3'UTR representa el gen indicador de luciferasa fusionado a la secuencia 3'UTR BCL2 tipo silvestre. También se transfectaron dos mutantes diferentes 3'UTR, uno carente de las 9 pb de la región de complementariedad miARN::ARNm en miR-15-a y miR-16-1 (pSR-15a/16-1 S + 3'M1), y el otro carente de los primeros 5 pb en la misma región de complementariedad (pSR-15a/16-1 S +3'M2). Todos los experimentos se llevaron a cabo dos veces por triplicado (n = 6).

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en el presente documento de manera intercambiable, un "producto génico miR", "microARN", "miR" o "miARN" se refiere a la transcripción procesada o no procesada de un gen miR. Como los productos génicos miR no se traducen en proteínas, la expresión "productos génicos miR" no incluye proteínas. La transcripción génica miR no procesada se denomina también un "precursor miR", y normalmente comprende una transcripción de aproximadamente 70-100 nucleótidos de longitud. El precursor miR se puede procesar por digestión con una ARNasa (por ejemplo, Dicer, Argonauta, ARNsc III (por ejemplo, ARNasa III de *E. coli*)) en una molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos. Esta molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos también se llama transcripción génica miR "procesada" o miARN "maduro".

La molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos se puede obtener a partir del precursor miR por medio de rutas de procesamiento naturales (por ejemplo, utilizando células intactas o lisados celulares) o por rutas de procesamiento sintético (por ejemplo, utilizando enzimas de procesamiento aisladas tales como Dicer aislada, Argonauta, o ARNasa III). Se entiende que la molécula de ARN activa de 19-25 nucleótidos también se puede producir directamente por síntesis química o biológica, sin que se procese a partir de un precursor miR.

Las secuencias de un gran número de productos génicos miR se proporcionan en la Tabla 1. Todas las secuencias de ácido nucleico del presente documento se dan en la dirección 5' a 3'.

ES 2 523 989 T3

Tabla 1 – Secuencias de productos génicos miR humanos

Nombre	Secuencia precursora (5' to 3')*	SEC ID Nº
<i>let-7a-1-prec</i>	CACTGTGGGATGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGG GTCACACCCACCACGGGAGATAACTATACAATCTAC TGCTTTCCCTAACGTG	63
<i>let-7a-2-prec</i>	AGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTAGAATTACAT CAAGGGAGATAACTGTACAGCCTCCTAGCTTTCT	64
<i>let-7a-3-prec</i>	GGGTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTGGGGCTCTGCC CTGCTATGGGATAACTATACAATCTACTGTCTTTCT	65
<i>let-7a-4-prec</i>	GTGACTGCATGCTCCTGAGGTAGTAGGTTGTA TAGTTTAGAATTACACAAGGGAGATAACTGTACAGC CTCCTAGCTTTCTTTGGGTCTTGCACTAAACAAC	66
<i>let-7b-prec</i>	GGCGGGGTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTCAGGGC AGTGATGTTGCCCTCGGAAGATAACTATACAACCTA CTGCCCTCCCTG	67
<i>let-7c-prec</i>	GCATCCGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTAGAG TTACACCCTGGGAGTTAACTGTACAACCTTCTAGCTT TCCTTGGAGC	68
<i>let-7d-prec</i>	CCTAGGAAGAGGTAGTAGGTTGCATAGTTTTAGGGC AGGGATTTTGGCCACAAGGAGGTAACTATACGACCT GCTGCCTTTCTTAGG	69
<i>let-7d-v1-prec</i>	CTAGGAAGAGGTAGTAGTTTGCATAGTTTTAGGGCAA AGATTTTGGCCACAAGTAGTTAGCTATACGACCTGCA GCCTTTTGTAG	70
<i>let-7d-v2-prec</i>	CTGGCTGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTGGTCGGGTTG TGACATTGCCCGCTGTGGAGATAACTGCGCAAGCTAC TGCTTGCTAG	71
<i>let-7e-prec</i>	CCCGGGCTGAGGTAGGAGGTTGTATAGTTGAGGAGG ACACCCAAGGAGATCACTATACGGCCTCCTAGCTTTC CCCAGG	72
<i>let-7f-1-prec</i>	TCAGAGTGAGGTAGTAGATTGTATAGTTGTGGGGTAG TGATTTTACCCTGTTCCAGGAGATAACTATACAATCTA TTGCCCTCCCTGA	73
<i>let-7f-2-prec-1</i>	CTGTGGGATGAGGTAGTAGATTGTATAGTTGTGGGGT AGTGATTTTACCCTGTTCCAGGAGATAACTATACAATC TATTGCCCTCCCTGA	74
<i>let-7f-2-prec-2</i>	CTGTGGGATGAGGTAGTAGATTGTATAGTTTGGGT CATACCCCATCTTGGAGATAACTATACAGTCTACTGT CTTCCCACGG	75
<i>let-7g-prec</i>	TTGCCTGATTCCAGGCTGAGGTAGTAGTTTGTACAGT TTGAGGGTCTATGATAACCACCCGGTACAGGAGATAA CTGTACAGGCCACTGCCCTTGCCAGGAACAGCGCGC	76
<i>let-7i-prec</i>	CTGGCTGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTGGTCGGGTTG TGACATTGCCCGCTGTGGAGATAACTGCGCAAGCTAC TGCCTTGCTAG	77
<i>mir-001b-1-prec-1</i>	ACCTACTCAGAGTACATACTTCTTTATGTACCCATAT GAACATACAATGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTA TTTTTGGTAGGC	78
<i>mir-001b-1-prec-2</i>	CAGCTAACAACCTTAGTAATACCTACTCAGAGTACATA CTTCTTTATGTACCCATATGAACATACAATGCTATGG AATGTAAAGAAGTATGTATTTTTGGTAGGCAATA	79
<i>mir-001b-2-prec</i>	GCCTGCTTGGGAAACATACTTCTTTATATGCCCATAT GGACCTGCTAAGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTA TCTCAGGCCGGG	80
<i>mir-001b-prec</i>	TGGGAAACATACTTCTTTATATGCCCATATGGACCTG CTAAGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTATCTCA	81
<i>mir-001d-prec</i>	ACCTACTCAGAGTACATACTTCTTTATGTACCCATAT GAACATACAATGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTA TTTTTGGTAGGC	82

ES 2 523 989 T3

<i>mir-007-1</i>	TGGATGTTGGCCTAGTTCTGTGTGGAAGACTAGTGAT TTTGTGTTTTAGATAACTAAATCGACAACAAATCA CAGTCTGCCATATGGCACAGGCCATGCCTCTACA	83
<i>mir-007-1-prec</i>	TTGGATGTTGGCCTAGTTCTGTGTGGAAGACTAGTGA TTTTGTGTTTTAGATAACTAAATCGACAACAAATC ACAGTCTGCCATATGGCACAGGCCATGCCTCTACAG	84
<i>mir-007-2-prec</i>	CTGGATACAGAGTGGACCGGCTGGCCCCATCTGGAA GACTAGTGATTTTGTGTTGTCTTACTGCGCTCAACA ACAAATCCCAGTCTACCTAATGGTGCCAGCCATCGCA	85
<i>mir-007-3-prec</i>	AGATTAGAGTGGCTGTGGTCTAGTGCTGTGTGGAAGA CTAGTGATTTTGTGTTCTGATGTACTACGACAACAA GTCACAGCCGGCCTCATAGCGCAGACTCCCTTCGAC	86
<i>mir-009-1</i>	CGGGGTTGGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA GTGGTGTGGAGTCTTCATAAAGCTAGATAACCGAAA GTA AAAATAACCCCA	87
<i>mir-009-2</i>	GGAAGCGAGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATG AGTGTATTGGTCTTCATAAAGCTAGATAACCGAAAAGT AAAACTCCTTCA	88
<i>mir-009-3</i>	GGAGGCCCGTTTCTCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA GTGCCACAGAGCCGTCATAAAGCTAGATAACCGAAA GTAGAAATGATTCTCA	89
<i>mir-010a-prec</i>	GATCTGTCTGTCTTCTGTATATACCCTGTAGATCCGA ATTTGTGTAAGGAATTTTGTGGTCACAAATTCGTATC TAGGGGAATATGTAGTTGACATAAACACTCCGCTCT	90
<i>mir-010b-prec</i>	CCAGAGGTTGTAACGTTGTCTATATATACCCTGTAGA ACCGAATTTGTGTGGTATCCGTATAGTCACAGATTCCG ATTCTAGGGGAATATATGGTCGATGCAAAAACCTTCA	91
<i>mir-015a-2-prec</i>	GCGCGAATGTGTGTTTTAAAAAATAAACCTTGGA GTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATTTTGAA AAGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAATAC	92
<i>mir-015a-prec</i>	CCTTGGAGTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGA TTTTGAAAAGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAA AATACAAGG	93
<i>mir-015b-prec-1</i>	CTGTAGCAGCACATCATGGTTTACATGCTACAGTCAA GATGCGAATCATTATTTGCTGCTCTAG	94
<i>mir-015b-prec-2</i>	TTGAGGCCTTAAAGTACTGTAGCAGCACATCATGGTT TACATGCTACAGTCAAGATGCGAATCATTATTTGCTG CTCTAGAAATTTAAGGAAATTCAT	95
<i>mir-016a-chr13</i>	GTCAGCAGTGCCTTAGCAGCACGTAATATTGGCGTT AAGATTCTAAAATTATCTCCAGTATTAAGTGTGCTGC TGAAGTAAGGTTGAC	96
<i>mir-016b-chr3</i>	GTTCCACTCTAGCAGCACGTAATATTGGCGTAGTGA AATATATATTAACACCAATATTACTGTGCTGCTTTA GTGTGAC	97
<i>mir-016-prec-13</i>	GCAGTGCCTTAGCAGCACGTAATATTGGCGTTAAGA TTCTAAAATTATCTCCAGTATTAAGTGTGCTGCTGAA GTAAGGT	98
<i>mir-017-prec</i>	GTCAGAATAATGTCAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT GATATGTGCATCTACTGCAGTGAAGGCACTTGTAGCA TTATGGTGAC	99
<i>mir-018-prec</i>	TGTTCTAAGGTGCATCTAGTGCAGATAGTGAAGTAGA TTAGCATCTACTGCCCTAAGTCTCCTTCTGGCA	100
<i>mir-018-prec-13</i>	TTTTGTCTAAGGTGCATCTAGTGCAGATAGTGAAG TAGATTAGCATCTACTGCCCTAAGTCTCCTTCTGGC ATAAGAA	101
<i>mir-019a-prec</i>	GCAGTCTCTGTTAGTTTTGCATAGTTGCACTACAAG AGAATGTAGTTGTGCAAATCTATGCAAAAAGTATGGT GGCCTGC	102
<i>mir-019a-prec-13</i>	CAGTCCTCTGTTAGTTTTGCATAGTTGCACTACAAGA AGAATGTAGTTGTGCAAATCTATGCAAAAAGTATGGT GGCCTG	103

ES 2 523 989 T3

<i>mir-019b-1-prec</i>	CACTGTTCTATGGTTAGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGC TGTGTGATATTCTGCTGTGCAAATCCATGCAAAACTG ACTGTGGTAGTG	104
<i>mir-019b-2-prec</i>	ACATTGCTACTTACAATTAGTTTTGCAGGTTTGCATTT CAGCGTATATATGTATATGTGGCTGTGCAAATCCATG CAAAACTGATTGTGATAATGT	105
<i>mir-019b-prec-13</i>	TTCTATGGTTAGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGCTGTGT GATATTCTGCTGTGCAAATCCATGCAAAACTGACTGT GGTAG	106
<i>mir-019b-prec-X</i>	TTACAATTAGTTTTGCAGGTTTGCATTTTGCAGGTATAT ATGTATATGTGGCTGTGCAAATCCATGCAAAACTGAT TGTGAT	107
<i>mir-020-prec</i>	GTAGCACTAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGTGTTTAG TTATCTACTGCATTATGAGCACTTAAAGTACTGC	108
<i>mir-021-prec</i>	TGTCGGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGTTGAA TCTCATGGCAACACCAGTCGATGGGCTGTCTGACA	109
<i>mir-021-prec-17</i>	ACCTTGTCGGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGT TGAATCTCATGGCAACACCAGTCGATGGGCTGTCTGA CATTTTG	110
<i>mir-022-prec</i>	GGCTGAGCCGCAGTAGTTCTTCAGTGGCAAGCTTTAT GTCCTGACCCAGCTAAAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT TGCCCTCTGCC	111
<i>mir-023a-prec</i>	GGCCGGCTGGGGTTCCTGGGGATGGGATTTGCTTCCT GTCACAAATCACATTGCCAGGGATTTCCAACCGACC	112
<i>mir-023b-prec</i>	CTCAGGTGCTCTGGCTGCTTGGGTTTCTGGCATGCTG ATTTGTGACTTAAGATTAATAACATTGCCAGGGAT TACCACGCAACCACGACCTTGGC	113
<i>mir-023-prec-19</i>	CCACGGCCGGCTGGGGTTCCTGGGGATGGGATTTGCT TCCTGTCACAAATCACATTGCCAGGGATTTCCAACCG ACCCTGA	114
<i>mir-024-1-prec</i>	CTCCGGTGCCTACTGAGCTGATATCAGTTCTCATTTA CACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGGAG	115
<i>mir-024-2-prec</i>	CTCTGCCTCCCGTGCCTACTGAGCTGAAACACAGTTG GTTTGTGTACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGGG	116
<i>mir-024-prec-19</i>	CCCTGGGCTCTGCCTCCCGTGCCTACTGAGCTGAAAC ACAGTTGGTTTGTGTACACTGGCTCAGTTCAGCAGGA ACAGGGG	117
<i>mir-024-prec-9</i>	CCCTCCGGTGCCTACTGAGCTGATATCAGTTCTCATTT TACACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGCATC	118
<i>mir-025-prec</i>	GGCCAGTGTGAGAGGCGGAGACTTGGGCAATTGCT GGACGCTGCCCTGGGCATTGCACTTGTCTCGGTCTGA CAGTGCCGGCC	119
<i>mir-026a-prec</i>	AGGCCGTGGCCTCGTTCAAGTAATCCAGGATAGGCTG TGCAGGTCCCAATGGCCTATCTTGGTTACTTGCACGG GGACGCGGGCCT	120
<i>mir-026b-prec</i>	CCGGGACCCAGTTCAAGTAATTCAGGATAGGTTGTGT GCTGTCCAGCCTGTTCTCCATTACTTGGCTCGGGAC CGG	121
<i>mir-027a-prec</i>	CTGAGGAGCAGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGTC CACACCAAGTCGTGTTACAGTGGCTAAGTTCCGCC CCCAG	122
<i>mir-027b-prec-1</i>	AGGTGCAGAGCTTAGCTGATTGGTGAACAGTGATTG GTTTCCGCTTTGTTACAGTGGCTAAGTTCTGCACCT	123
<i>mir-027b-prec-2</i>	ACCTCTAACAAGGTGCAGAGCTTAGCTGATTGGTG AACAGTGATTGGTTTCCGCTTTGTTACAGTGGCTAA GTTCTGCACCTGAAGAGAAGGTG	124
<i>mir-027-prec-19</i>	CCTGAGGAGCAGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGT CCACACCAAGTCGTGTTACAGTGGCTAAGTTCCGCC CCCAGG	125

ES 2 523 989 T3

<i>mir-028-prec</i>	GGTCCTTGCCCTCAAGGAGCTCACAGTCTATTGAGTT ACCTTTCTGACTTTCCCACTAGATTGTGAGCTCCTGG AGGGCAGGCACT	126
<i>mir-029a-2</i>	CCTTCTGTGACCCCTTAGAGGATGACTGATTTCTTTTG GTGTTCAAGTCAATATAATTTCTAGCACCATCTGA AATCGGTTATAATGATTGGGGAAGAGCACCATG	127
<i>mir-029a-prec</i>	ATGACTGATTTCTTTTGGTGTTCAGAGTCAATATAATT TTCTAGCACCATCTGAAATCGGTTAT	128
<i>mir-029c-prec</i>	ACCACTGGCCCATCTCTTACACAGGCTGACCGATTTCT TCCTGGTGTTCAGAGTCTGTTTTGTCTAGCACCATTT GAAATCGGTTATGATGTAGGGGAAAAGCAGCAGC	129
<i>mir-030a-prec</i>	GCGACTGTAAACATCCTCGACTGGAAGCTGTGAAGC CACAGATGGGCTTTCAGTCGGATGTTTGCAGCTGC	130
<i>mir-030b-prec-1</i>	ATGTAAACATCCTACACTCAGCTGTAATACATGGATT GGCTGGGAGGTGGATGTTTACGT	131
<i>mir-030b-prec-2</i>	ACCAAGTTTCAGTTCATGTAAACATCCTACACTCAGC TGTAATACATGGATTGGCTGGGAGGTGGATGTTTACT TCAGCTGACTTGA	132
<i>mir-030c-prec</i>	AGATACTGTAAACATCCTACACTCTCAGCTGTGGAAA GTAAGAAAGCTGGGAGAAGGCTGTTTACTCTTTCT	133
<i>mir-030d-prec</i>	GTTGTTGTAAACATCCCGACTGGAAGCTGTAAGACA CAGCTAAGCTTTCAGTCAGATGTTTGTCTGCTAC	134
<i>mir-031-prec</i>	GGAGAGGAGGCAAGATGCTGGCATAGCTGTTGAACT GGGAACCTGCTATGCCAACATATTGCCATCTTTCC	135
<i>mir-032-prec</i>	GGAGATATTGCACATTAAGTTGATGTTGTGACAG GCCTCAATGCAATTTAGTGTGTGATATTTTC	136
<i>mir-033b-prec</i>	GGGGCCGAGAGAGGCGGGCGCCCGCGGTGCATT GCTGTTGCATTGCACGTGTGTGAGGCGGTGCAGTGC CTCGGCAGTGCAGCCCGAGCCGGCCCTGGCACCA C	137
<i>mir-033-prec</i>	CTGTGGTGCATTGTAGTTGCATTGCATGTTCTGGTGG TACCCATGCAATGTTTCCACAGTGCATCACAG	138
<i>mir-034-prec</i>	GGCCAGCTGTGAGTGTTCCTTTGGCAGTGTCTTAGCT GGTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCAA GTATACTGCCCTAGAAGTGTGCTGCACGTTGTGGGGCCC	139
<i>mir-091-prec-13</i>	TCAGAATAATGTCAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGTG ATATGTGCATCTACTGCAGTGAAGGCACTTGTAGCAT TATGGTGA	140
<i>mir-092-prec-13=092-1</i>	CTTTCTACACAGGTTGGGATCGGTTGCAATGCTGTGT TTCTGTATGGTATTGCACCTGTCCCGGCCTGTTGAGTT TGG	141
<i>mir-092-prec-X=092-2</i>	TCATCCCTGGGTGGGGATTTGTTGCATTAATTGTGTTT TATATAAAGTATTGCACTTGTCCCGGCCTGTGGAAGA	142
<i>mir-093-prec-7.1=093-1 (mir-093-prec-7.2=093-2)</i>	CTGGGGGCTCCAAAGTGCTGTTGCTGCAGGTAGTGTG ATTACCCAACCTACTGCTGAGCTAGCACTTCCCGAGC CCCCGG	143
<i>mir-095-prec-4</i>	AACACAGTGGGCACTCAATAAATGTCTGTTGAATTGA AATGCGTTACATTCAACGGGTATTTATTGAGCACCCA CTCTGTG	144
<i>mir-096-prec-7</i>	TGGCCGATTTTGGCACTAGCACATTTTGTGTTGTCT CTCCGCTCTGAGCAATCATGTGCAGTGCCAATATGGG AAA	145
<i>mir-098-prec-X</i>	GTGAGGTAGTAAGTTGTATTGTTGTGGGGTAGGGATA TTAGGCCCAATTAGAAGATAACTATACAACCTACTA CTTTCC	146
<i>mir-099b-prec-19</i>	GGCACCCACCCGTAGAACCGACCTTGCGGGGCCTTCG CCGCACACAAGCTCGTGTCTGTGGGTCCGTGTC	147

ES 2 523 989 T3

<i>mir-099-prec-21</i>	CCCATTGGCATAAAACCCGTAGATCCGATCTTGTGGTG AAGTGGACCGCACAAAGCTCGCTTCTATGGGTCTGTGT CAGTGTG	148
<i>mir-100-1/2-prec</i>	AAGAGAGAAGATATTGAGGCCTGTTGCCACAAACCC GTAGATCCGAACCTTGTGATTAGTCCGCACAAGCTT GTATCTATAGGTATGTGTCTGTTAGGCAATCTCAC	149
<i>mir-100-prec-11</i>	CCTGTTGCCACAAACCCGTAGATCCGAACCTTGTGGTA TTAGTCCGCACAAGCTTGTATCTATAGGTATGTGTCT GTTAGG	150
<i>mir-101-1/2-prec</i>	AGGCTGCCCTGGCTCAGTTATCACAGTGCTGATGCTG TCTATTCTAAAGGTACAGTACTGTGATAACTGAAGGA TGGCAGCCATCTTACCTTCCATCAGAGGAGCCTCAC	151
<i>mir-101-prec</i>	TCAGTTATCACAGTGCTGATGCTGTCCATTCTAAAGG TACAGTACTGTGATAACTGA	152
<i>mir-101-prec-1</i>	TGCCCTGGCTCAGTTATCACAGTGCTGATGCTGTCTA TTCTAAAGGTACAGTACTGTGATAACTGAAGGATGGCA	153
<i>mir-101-prec-9</i>	TGTCCTTTTTCGGTTATCATGGTACCGATGCTGTATAT CTGAAAGGTACAGTACTGTGATAACTGAAGAATGGTG	154
<i>mir-102-prec-1</i>	CTTCTGGAAGCTGGTTTCACATGGTGGCTTAGATTTTT CCATCTTTGTATCTAGCACCATTTGAAATCAGTGT AGGAG	155
<i>mir-102-prec-7.1 (mir-102-prec-7.2)</i>	CTTCAGGAAGCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGATTTA AATAGTGATTGTCTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTC TTGGGGG	156
<i>mir-103-2-prec (mir-103-prec-20)</i>	TTGTGCTTTCAGCTTCTTTACAGTGCTGCCTTGTAGCA TTCAGGTCAAGCAACATTGTACAGGGCTATGAAAGA ACCA	157
<i>mir-103-prec-5=103-1</i>	TACTGCCCTCGGCTTCTTTACAGTGCTGCCTTGTGCA TATGGATCAAGCAGCATTGTACAGGGCTATGAAGGC ATTG	158
<i>mir-104-prec-17</i>	AAATGTCAGACAGCCCATCGACTGGTGGTGGCCATGAG ATTCAACAGTCAACATCAGTCTGATAAGCTACCCGAC AAGG	159
<i>mir-105-prec-X.1 (mir-105-1; mir-105-prec-X.2; mir-105-2)</i>	TGTGCATCGTGGTCAAATGCTCAGACTCCTGTGGTGG CTGCTCATGCACCACGGATGTTTGAGCATGTGCTACG GTGTCTA	160
<i>mir-106-prec-X</i>	CCTTGGCCATGTAAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGCT TTTTGAGATCTACTGCAATGTAAGCACTTCTTACATT ACCATGG	161
<i>mir-107-prec-10</i>	CTCTCTGCTTTCAGCTTCTTTACAGTGTTGCCTTGTGG CATGGAGTTCAAGCAGCATTGTACAGGGCTATCAAA GCACAGA	162
<i>mir-122a-prec-1</i>	CCTTAGCAGAGCTGTGGAGTGTGACAATGGTGTGGT GTCTAAACTATCAAACGCCATTATCACACTAAATAGC TACTGCTAGGC	163
<i>mir-122a-prec-2</i>	AGCTGTGGAGTGTGACAATGGTGTGGTGTGTCCTAACT ATCAAACGCCATTATCACACTAAATAGCT	164
<i>mir-123-prec</i>	ACATTATTACTTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAA CTCGTACCGTGAGTAATAATGCGC	165
<i>mir-124a-1-prec-1</i>	tcctctCAGGAGAAAGGCCTCTCTCCTCGTTCACAGC GGACCTTGATTTAAATGTCCATACAATTAAGGCACGC GGTGAATGCCAAGAATGGGGCT	166
<i>mir-124a-1-prec-2</i>	AGGCCTCTCTCCTCGTGTTCACAGCGGACCTTGATT AAATGTCCATACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCA AGAATGGGGCTG	167
<i>mir-124a-2-prec</i>	ATCAAGATTAGAGGCTCTGCTCTCCGTGTTACACAGCG GACCTTGATTTAATGTCCATACAATTAAGGCACGCGGT GAATGCCAAGAGCGGAGCCTACGGCTGCACTTGAAG	168
<i>mir-124a-3-prec-1</i>	CCCGCCCCAGCCCTGAGGGCCCCCTCTGCGTGTTCACA GCGGACCTTGATTTAATGTCTATACAATTAAGGCACG CGGTGAATGCCAAGAGAGGCGCCTCCGCCGCTCCTT	169

ES 2 523 989 T3

<i>mir-124a-3-prec-2</i>	TGAGGGCCCCTCTGCGTGTTACAGCGGACCTTGATT TAATGTCTATAACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCAA GAGAGGCGCCTCC	170
<i>mir-124a-prec</i>	CTCTGCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAATGTCTA TACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCAAGAG	171
<i>mir-124b-prec</i>	CTCTCCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAATGTCAT ACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCAAGAG	172
<i>mir-125a-prec-1</i>	TGCCAGTCTCTAGGTCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG AGGACATCCAGGGTCACAGGTGAGGTTCTTGGGAGC CTGGCGTCTGGCC	173
<i>mir-125a-prec-2</i>	GGTCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGAGGACATCCAGG GTCACAGGTGAGGTTCTTGGGAGCCTGG	174
<i>mir-125b-1-1</i>	ACATTGTTGCGCTCCTCTCAGTCCCTGAGACCCTAAC TTGTGATGTTTACCGTTTAAATCCACGGGTTAGGCTC TTGGGAGCTGCGAGTCGTGCTTTTGCATCCTGGA	175
<i>mir-125b-1-2</i>	TGCGCTCCTCTCAGTCCCTGAGACCCTAACCTTGTGAT GTTTACCGTTTAAATCCACGGGTTAGGCTCTTGGGAG CTGCGAGTCGTGCT	176
<i>mir-125b-2-prec-1</i>	ACCAGACTTTTCTAGTCCCTGAGACCCTAACCTTGTG AGGTATTTTAGTAACATCACAAGTCAGGCTCTTGGGA CCTAGGCGGAGGGGA	177
<i>mir-125b-2-prec-2</i>	CCTAGTCCCTGAGACCCTAACCTTGTGAGGTATTTAG TAACATCACAAGTCAGGCTCTTGGGACCTAGGC	178
<i>mir-126-prec-1</i>	CGCTGGCGACGGGACATTATTACTTTTGGTACGCGCT GTGACACTTCAAACCTCGTACCGTGAGTAATAATGCGC CGTCCACGGCA	179
<i>mir-126-prec-2</i>	ACATTATTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAA CTCGTACCGTGAGTAATAATGCGC.	180
<i>mir-127-prec-1</i>	TGTGATCACTGTCTCCAGCCTGCTGAAGCTCAGAGGG CTCTGATTCAGAAAGATCATCGGATCCGTCTGAGCTT GGCTGGTCGGAAGTCTCATCATC	181
<i>mir-127-prec-2</i>	CCAGCCTGTGTAAGCTCAGAGGGCTCTGATTCAGAA AGATCATCGGATCCGTCTGAGCTTGGCTGGTCGG	182
<i>mir-128a-prec</i>	TGAGCTGTTGGATTTCGGGGCCGTAGCACTGTCTGAGA GGTTTACATTTCTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTCAG CTGCTTC	183
<i>mir-128b-prec</i>	GCCCGGCAGCCACTGTGCAGTGGGAAGGGGGGCCGA TACACTGTACGAGAGTGAGTAGCAGGTCTCACAGTG AACCGGTCTCTTTCCCTACTGTGTCACACTCCTAATG G	184
<i>mir-128-prec</i>	GTTGGATTTCGGGGCCGTAGCACTGTCTGAGAGGTTTA CATTTCTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTCAGC	185
<i>mir-129-prec</i>	TGGATCTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCTGTTCCCTCTCAA CAGTAGTCAGGAAGCCCTTACCCCAAAAAGTATCTA	186
<i>mir-130a-prec</i>	TGCTGCTGGCCAGAGCTCTTTTTCACATTGTGCTACTGT CTGCACCTGTCACTAGCAGTGCAATGTTAAAAGGGCA TTGGCCGTGTAGTG	187
<i>mir-131-1-prec</i>	gccaggagggcggGTTGGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCT GTATGAGTGGTGTGGAGTCTTATAAAGCTAGATAAC CGAAAGTAAAAATAACCCCATACACTGCGCAG	188
<i>mir-131-3-prec</i>	CACGGCGCGGCAGCGGCACTGGCTAAGGGAGGCCCG TTTCTCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAGTGCCACAG AGCCGTCATAAAGCTAGATAACCGAAAGTAGAAATG	189
<i>mir-131-prec</i>	GTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAGTGATTG GTCTTCATAAAGCTAGATAACCGAAAGTAAAAAC	190
<i>mir-132-prec-1</i>	CCGCCCCGCGTCTCCAGGGCAACCGTGGCTTTTCGAT TGTTACTGTGGGAAGTGGAGGTAACAGTCTACAGCCA TGGTCGCCCCGAGCACGCCACGCGC	191

ES 2 523 989 T3

<i>mir-132-prec-2</i>	GGGCAACCGTGGCTTTTCGATTGTTACTGTGGAACTG GAGGTAACAGTCTACAGCCATGGTCGCC	192
<i>mir-133a-1</i>	ACAATGCTTTGCTAGAGCTGGTAAAATGGAACCAA TCGCCTCTTCAATGGATTGGTCCCCTCAACCAGCT GTAGCTATGCATTGA	193
<i>mir-133a-2</i>	GGGAGCCAAATGCTTTGCTAGAGCTGGTAAAATGGA ACCAAATCGACTGTCCAATGGATTTGGTCCCCTTCAA CCAGCTGTAGCTGTGCATTGATGGCGCCG	194
<i>mir-133-prec</i>	GCTAGAGCTGGTAAAATGGAACCAAATCGCCTCTTCA ATGGATTTGGTCCCCTCAACCAGCTGTAGC	195
<i>mir-134-prec-1</i>	CAGGGTGTGTGACTGGTTGACCAGAGGGGCATGCAC TGTGTTACCCTGTGGGCCACCTAGTCACCAACCCTC	196
<i>mir-134-prec-2</i>	AGGGTGTGTGACTGGTTGACCAGAGGGGCATGCACT GTGTTACCCTGTGGGCCACCTAGTCACCAACCCT	197
<i>mir-135-1-prec</i>	AGGCCTCGCTGTTCTCTATGGCTTTTTATTCCATGTG ATTCTACTGCTCACTCATATAGGGATTGGAGCCGTGG CGCACGGCGGGGACA	198
<i>mir-135-2-prec</i>	AGATAAATTCACCTAGTGCTTTATGGCTTTTTATTCC TATGTGATAGTAATAAAGTCTCATGTAGGGATGGAA GCCATGAAATACATTGTGAAAAATCA	199
<i>mir-135-prec</i>	CTATGGCTTTTTATTCCATGTGATTCTACTGCTCACT CATATAGGGATTGGAGCCGTGG	200
<i>mir-136-prec-1</i>	TGAGCCCTCGGAGGACTCCATTTGTTTTGATGATGGA TTCTTATGCTCCATCATCGTCTCAAATGAGTCTTCAGA GGTTCT	201
<i>mir-136-prec-2</i>	GAGGACTCCATTTGTTTTGATGATGGATTCTTATGCTC CATCATCGTCTCAAATGAGTCTTC	202
<i>mir-137-prec</i>	CTTCGGTGACGGGTATTCTTGGGTGGATAATACGGAT TACGTTGTTATTGCTTAAGAATACGCGTAGTCGAGG	203
<i>mir-138-1-prec</i>	CCCTGGCATGGTGTGGTGGGGCAGCTGGTGTGTGAA TCAGGCCGTTGCCAATCAGAGAACGGCTACTTCACAA CACCAGGGCCACACCACACTACAGG	204
<i>mir-138-2-prec</i>	CGTTGCTGCAGCTGGTGTGTGAATCAGGCCGACGAG CAGCGCATCCTCTTACCCGGCTATTTACGACACCAG GGTTCATCA	205
<i>mir-138-prec</i>	CAGCTGGTGTGTGAATCAGGCCGACGAGCAGCGCA TCCTCTTACCCGGCTATTTACGACACCAGGGTTG	206
<i>mir-139-prec</i>	GTGTATTCTACAGTGCACGTGCTCCAGTGTGGCTCG GAGGCTGGAGACGCGGCCCTGTTGGAGTAAC	207
<i>mir-140</i>	TGTGTCTCTCTGTGTCTGCTGCCAGTGGTTTTACCCTA TGGTAGGTTACGTCATGCTGTTCTACCACAGGGTAGA ACCACGGACAGGATACCGGGGCACC	208
<i>mir-140as-prec</i>	TCCTGCCAGTGGTTTTACCCTATGGTAGGTTACGTCA TGCTGTTCTACCACAGGGTAGAACCACGGACAGGA	209
<i>mir-140s-prec</i>	CCTGCCAGTGGTTTTACCCTATGGTAGGTTACGTCA GCTGTTCTACCACAGGGTAGAACCACGGACAGG	210
<i>mir-141-prec-1</i>	CGGCCGCCCCTGGGTCCATCTTCCAGTACAGTGTGG ATGGTCTAATTGTGAAGCTCCTAACACTGTCTGGTAA AGATGGCTCCCGGGTGGGTTCC	211
<i>mir-141-prec-2</i>	GGGTCCATCTTCCAGTACAGTGTGGATGGTCTAATT GTGAAGCTCCTAACACTGTCTGGTAAAGATGGCCC	212
<i>mir-142as-prec (mir-142s-prec)</i>	ACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTAACAGCACTGGA GGGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGATG	213
<i>mir-142s-prec</i>	ACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTAACAGCACTGGA GGGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGATG	214

ES 2 523 989 T3

<i>mir-143-prec-1</i>	GCGCAGCGCCCTGTCTCCAGCCTGAGGTGCAGTGCT GCATCTCTGGTCAGTTGGGAGTCTGAGATGAAGCACT GTAGCTCAGGAAGAGAGAAGTTGTTCTGCAGC	215
<i>mir-143-prec-2</i>	CCTGAGGTGCAGTGCTGCATCTCTGGTCAGTTGGGAG TCTGAGATGAAGCACTGTAGCTCAGG	216
<i>mir-144-prec-1</i>	TGGGGCCCTGGCTGGGATATCATCATATACTGTAAGT TTGCGATGAGACACTACAGTATAGATGATGTAAGT CCGGGCACCCCC	217
<i>mir-144-prec-2</i>	GGCTGGGATATCATCATATACTGTAAGTTTGGCGATGA GACACTACAGTATAGATGATGTAAGT	218
<i>mir-145-prec-1</i>	CACCTTGTCTCACGGTCCAGTTTTCCAGGAATCCC TTAGATGCTAAGATGGGGATTCTGGAAATACTGTTCT TTGAGGTCATGGTT	219
<i>mir-145-prec-2</i>	CTCACGGTCCAGTTTTCCAGGAATCCCTTAGATGCT AAGATGGGGATTCTGGAAATACTGTTCTTGAG	220
<i>mir-146-prec-1</i>	CCGATGTGTATCCTCAGCTTTGAGAAGTGAATCCAT GGGTTGTGTGTCAGTGTGACACCTCTGAAATTCAGTTCT TCAGCTGGGATATCTCTGTCATCGT	221
<i>mir-146-prec-2</i>	AGCTTTGAGAAGTGAATCCATGGGTTGTGTCAGTGT CAGACCTGTGAAATTCAGTTCTTCAGCT	222
<i>mir-147-prec</i>	AATCTAAAGACAACATTTCTGCACACACACCAGACTA TGGAAGCCAGTGTGTGGAAATGCTTCTGCTAGATT	223
<i>mir-148-prec</i>	GAGGCAAAGTTCTGAGACACTCCGACTCTGAGTATG ATAGAAGTCAGTGCACACTACAGAAGTTTGTCTC	224
<i>mir-149-prec-1</i>	GCCGGCGCCCCGAGCTCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC GTGCTTGTCCGAGGAGGGAGGGAGGGACGGGGGCTG TGCTGGGGCAGCTGGA	225
<i>mir-149-prec-2</i>	GCTCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCCGTGCTTGTCCGAG GAGGGAGGGAGGGAC	226
<i>mir-150-prec-1</i>	CTCCCCATGGCCCTGTCTCCCAACCCTTGTACCAGTG CTGGGCTCAGACCCTGGTACAGGCCTGGGGGACAGG GACCTGGGGAC	227
<i>mir-150-prec-2</i>	CCCTGTCTCCCAACCCTTGTACCAGTGCTGGGCTCAG ACCCTGGTACAGGCCTGGGGGACAGGG	228
<i>mir-151-prec</i>	CCTGCCCTCGAGGAGCTCACAGTCTAGTATGTCTCAT CCCCTACTAGACTGAAGCTCCTTGAGGACAGG	229
<i>mir-152-prec-1</i>	TGTCCCCCGGCCAGGTTCTGTGATACACTCCGAC TCGGGCTCTGGAGCAGTCACTGATGACAGAAGTTG GGCCCGAAGGACC	230
<i>mir-152-prec-2</i>	GGCCCAGGTTCTGTGATACACTCCGACTCGGGCTCTG GAGCAGTCAGTGCATGACAGAAGTTGGGCCCGG	231
<i>mir-153-1-prec-1</i>	CTCACAGCTGCCAGTGTCAATTTTGTGATCTGCAGCT AGTATTCTCACTCCAGTTGCATAGTCACAAAAGTGAT CATTGGCAGGTGTGGC	232
<i>mir-153-1-prec-2</i>	tctctctccctcACAGCTGCCAGTGTCAATTGTACAAAAGT GATCATTGGCAGGTGTGGCTGCTGCATG	233
<i>mir-153-2-prec-1</i>	AGCGGTGGCCAGTGTCAATTTTGTGATGTTGCAGCTA GTAATATGAGCCCAGTTGCATAGTCACAAAAGTGATC ATTGGAAACTGTG	234
<i>mir-153-2-prec-2</i>	CAGTGTCAATTTTGTGATGTTGCAGCTAGTAATATGA GCCAGTTGCATAGTCACAAAAGTGATCATTG	235
<i>mir-154-prec-1</i>	GTGGTACTTGAAGATAGGTTATCCGTGTTGCCTTCGC TTTATTTGTGACGAATCATAACCGTTGACCTATTTTT CAGTACCAA	236
<i>mir-154-prec-2</i>	GAAGATAGGTTATCCGTGTTGCCTTCGCTTTATTTGTG ACGAATCATAACCGTTGACCTATTTTT	237

ES 2 523 989 T3

<i>mir-155-prec</i>	CTGTTAATGCTAATCGTGATAGGGGTTTTTGCCTCCA ACTGACTCCTACATATTAGCATTAAACAG	238
<i>mir-16-2-prec</i>	CAATGTCAGCAGTGCCTTAGCAGCACGTAATATTGG CGTTAAGATTCTAAAATTATCTCCAGTATTAAGTGTG CTGCTGAAGTAAGGTTGACCATACTACAGTTG	239
<i>mir-181a-prec</i>	AGAAGGGCTATCAGGCCAGCCTTCAGAGGACTCCAA GGAACATTCAACGCTGTCGGTGAGTTGGGATTTGAA AAAACCACTGACCGTTGACTGTACCTTGGGGTCTTA	240
<i>mir-181b-prec</i>	TGAGTTTTGAGGTTGCTTCAGTGAACATTCAACGCTG TCGGTGAGTTTGGAAATAAAATCAAACCATCGACCG TTGATTGTACCCTATGGCTAACCATCATCTACTCCA	241
<i>mir-181c-prec</i>	CGGAAAATTTGCCAAGGGTTTTGGGGGAACATTCAAC CTGTCGGTGAGTTTGGGCAGCTCAGGCAAACCATCGA CCGTTGAGTGGACCCTGAGGCCTGGAATTGCCATCCT	242
<i>mir-182-as-prec</i>	GAGCTGCTTGCCTCCCCCGTTTTTGGCAATGGTAGA ACTCACACTGGTGAGGTAACAGGATCCGGTGGTTCTA GACTTGCCAACATATGGGGCGAGGACTCAGCCGGCAC	243
<i>mir-182-prec</i>	TTTTGGCAATGGTAGAACTCACACTGGTGAGGTAAC AGGATCCGGTGGTTCTAGACTTGCCAACATATGG	244
<i>mir-183-prec</i>	CCGCAGAGTGTGACTCCTGTTCTGTGTATGGCACTGG TAGAATTCAGTGTGAACAGTCTCAGTCAGTGAATTAC CGAAGGGCCATAAACAGAGCAGAGACAGATCCACGA	245
<i>mir-184-prec-1</i>	CCAGTCACGTCCCCTTATCACTTTTCCAGCCCAGCTTT GTGACTGTAAGTGTGGACGGGAGAACTGATAAGGGT AGGTGATTGA	246
<i>mir-184-prec-2</i>	CCTTATCACTTTTCCAGCCCAGCTTTGTGACTGTAAGT GTTGGACGGGAGAACTGATAAGGGTAGG	247
<i>mir-185-prec-1</i>	AGGGGGCGAGGGATTGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA TGGTCCCCTCCCAGGGGCTGGCTTTCCTCTGGTCCTT CCCTCCA	248
<i>mir-185-prec-2</i>	AGGGATTGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGATGGTCCCC TCCCAGGGGCTGGCTTTCCTCTGGTCCTT	249
<i>mir-186-prec-1</i>	TGCTTGTAACCTTCCAAAGAATTCTCCTTTTGGGCTTT CTGGTTTTATTTAAGCCCAAAGGTGAATTTTTTGGG AAGTTTGAGCT	250
<i>mir-186-prec-2</i>	ACTTTCCAAAGAATTCTCCTTTTGGGCTTTCTGGTTTT ATTTAAGCCCAAAGGTGAATTTTTTGGGAAGT	251
<i>mir-187-prec</i>	GGTCGGGCTCACCATGACACAGTGTGAGACTCGGGC TACAACACAGGACCCGGGGCGCTGCTCTGACCCCTCG TGTCTTGTTGTCAGCCGGAGGGACGCAGGTCCGCA	252
<i>mir-188-prec-1</i>	TGCTCCCTCTCTCACATCCCTTGCATGGTGGAGGGTIG AGCTTTCTGAAAACCCCTCCCACATGCAGGGTTTGCA GGATGGCGAGCC	253
<i>mir-188-prec-2</i>	TCTCACATCCCTTGCATGGTGGAGGGTGAGCTTTCTG AAAACCCCTCCCACATGCAGGGTTTGCAGGA	254
<i>mir-189-prec-1</i>	CTGTGATTGGACCGCCCTCCGGTGCCTACTGAGCT GATATCAGTTCTCATTTTACACACTGGCTCAGTTCAG CAGGAACAGGAGTTCGAGCCCTTGAGCAA	255
<i>mir-189-prec-2</i>	CTCCGGTGCCTACTGAGCTGATATCAGTTCTCATTTTA CACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGGAG	256
<i>mir-190-prec-1</i>	TGCAGGCCTCTGTGTGATATGTTTGATATATTAGGTT GTTATTTAATCCAACATATATCAAACATATTCCTAC AGTGTCTTGCC	257
<i>mir-190-prec-2</i>	CTGTGTGATATGTTTGATATATTAGGTTGTTATTTAAT CCAACATATATCAAACATATTCCTACAG	258
<i>mir-191-prec-1</i>	CGGCTGGACAGCGGGCAACGGAATCCCAAAAGCAGC IGTTGTCTCCAGAGCATTCCAGCTGCGCTTGGATTTC GTCCCCTGCTCTCCTGCCT	259

ES 2 523 989 T3

<i>mir-191-prec-2</i>	AGCGGGCAACGGAATCCCAAAGCAGCTGTTGTCTC CAGAGCATTCCAGCTGCGCTTGGATTTTCGTCCCCTGC T	260
<i>mir-192-2/3</i>	CCGAGACCGAGTGCACAGGGCTCTGACCTATGAATT GACAGCCAGTGTCTCGTCTCCCCTCTGGCTGCCAAT TCCATAGGTCACAGGTATGTTGCGCTCAATGCCAG	261
<i>mir-192-prec</i>	GCCGAGACCGAGTGCACAGGGCTCTGACCTATGAAT TGACAGCCAGTGTCTCGTCTCCCCTCTGGCTGCCAA TTCCATAGGTCACAGGTATGTTGCGCTCAATGCCAGC	262
<i>mir-193-prec-1</i>	CGAGGATGGGAGCTGAGGGCTGGGTCTTTGCGGGCG AGATGAGGGTGTGCGATCAACTGGCTACAAAGTCC CAGTTCTCGGCCCG	263
<i>mir-193-prec-2</i>	GCTGGGTCTTTGCGGGCGAGATGAGGGTGTGGATC AACTGGCCTACAAAGTCCCAGT	264
<i>mir-194-prec-1</i>	ATGGTGTTATCAAGTGTAACAGCAACTCCATGTGGAC TGTGTACCAATTTCCAGTGGAGATGCTGTTACTTTTG ATGGTTACCAA	265
<i>mir-194-prec-2</i>	GTGTAACAGCAACTCCATGTGGACTGTGTACCAATTT CCAGTGGAGATGCTGTTACTTTTGAT	266
<i>mir-195-prec-1</i>	AGCTTCCCTGGCTCTAGCAGCACAGAAATATTGGCAC AGGGAAGCGAGTCTGCCAATATTGGCTGTGCTGCTCC AGGCAGGGTGGTG	267
<i>mir-195-prec-2</i>	TAGCAGCACAGAAATATTGGCACAGGGAAGCGAGTC TGCCAATATTGGCTGTGCTGCT	268
<i>mir-196-1-prec</i>	CTAGAGCTTGAATTGGAAGTCTGAGTGAATTAGGTA GTTTCATGTTGTTGGCCTGGGTTTCTGAACACAACA ACATTAACCACCCGATTACGGCAGTTACTGCTCC	269
<i>mir-196-1-prec</i>	GTGAATTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGCCTGGGTTT CTGAACACAACAACATTAACCACCCGATTAC	270
<i>mir-196-2-prec</i>	TGCTCGCTCAGCTGATCTGTGGCTTAGGTAGTTTCAT GTTGTTGGGATTGAGTTTTGAACTCGGCAACAAGAAA CTGCCTGAGTTACATCAGTCGGTTTTTCGTGAGGGC	271
<i>mir-196-prec</i>	GTGAATTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGCCTGGGTTT CTGAACACAACAACATTAACCACCCGATTAC	272
<i>mir-197-prec</i>	GGCTGTGCCGGGTAGAGAGGGCAGTGGGAGGTAAGA GCTCTTACCCTTACCACCTTCTCCACCCAGCATGG CC	273
<i>mir-198-prec</i>	TCATTGGTCCAGAGGGGAGATAGGTTCTGTGATTTT TCCTTCTTCTATAGAATAAATGA	274
<i>mir-199a-1-prec</i>	GCCAACCCAGTGTTCCAGACTACCTGTTCCAGGAGGCTC TCAATGTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGC	275
<i>mir-199a-2-prec</i>	AGGAAGCTTCTGGAGATCCTGCTCCGTCGCCCCAGTG TTCAGACTACCTGTTCCAGGACAATGCCGTTGTACAGT AGTCTGCACATTGGTTAGACTGGGCAAGGGAGAGCA	276
<i>mir-199b-prec</i>	CCAGAGGACACCTCCACTCCGTCTACCCAGTGTITAG ACTATCTGTTCCAGGACTCCCAAATTGTACAGTAGTCT GCACATTGGTTAGGCTGGGCTGGGTTAGACCCTCGG	277
<i>mir-199s-prec</i>	GCCAACCCAGTGTTCCAGACTACCTGTTCCAGGAGGCTC TCAATGTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGC	278
<i>mir-200a-prec</i>	GCCGTGGCCATCTTACTGGGCAGCATTGGATGGAGTC AGGTCTCTAATACTGCCTGGTAATGATGACGGC	279
<i>mir-200b-prec</i>	CCAGCTCGGGCAGCCGTGGCCATCTTACTGGGCAGCA TTGGATGGAGTCAGGTCTCTAATACTGCCTGGTAATG ATGACGGCGGAGCCCTGCAG	280
<i>mir-202-prec</i>	GTTCCTTTTTCTATGCATATACTTCTTTGAGGATCTG GCCTAAAGAGGTATAGGGCATGGGAAGATGGAGC	281

ES 2 523 989 T3

<i>mir-203-prec</i>	GTGTTGGGGACTCGCGGCTGGGTCCAGTGGTTCTTA ACAGTTCAACAGTTCTGTAGCGCAATTGTGAAATGTT TAGGACCACTAGACCCGGCGGGCGCGGACAGCGA	282
<i>mir-204-prec</i>	GGCTACAGTCTTTTCATGTGACTCGTGGACTTCCCT TTGTCATCCTATGCCTGAGAATATATGAAGGAGGCTG GGAAGGCAAAGGGACGTTCAATTGTCATCACTGGC	283
<i>mir-205-prec</i>	AAAGATCCTCAGACAATCCATGTGCTTCTCTTGTCT TCATTCCACCGGAGTCTGTCTCATACCCAACCAGATT TCAGTGGAGTGAAGTTCAGGAGGCATGGAGCTGACA	284
<i>mir-206-prec-1</i>	TGCTTCCCGAGGCCACATGCTTCTTTATATCCCCATAT GGATTACTTTGCTATGGAATGTAAGGAAGTGTGTGGT TTCGGCAAGTG	285
<i>mir-206-prec-2</i>	AGGCCACATGCTTCTTTATATCCCCATATGGATTACTT TGCTATGGAATGTAAGGAAGTGTGTGGTTTT	286
<i>mir-208-prec</i>	TGACGGGCGAGCTTTTGGCCCGGTTATACCTGATGC TCACGTATAAGACGAGCAAAAAGCTTGTTGGTCA	287
<i>mir-210-prec</i>	ACCCGGCAGTGCCTCCAGGCGCAGGGCAGCCCCTGC CCACCGCACACTGCGCTGCCCCAGACCCACTGTGCGT GTGACAGCGGCTGATCTGTGCCTGGGCAGCGGACC C	288
<i>mir-211-prec</i>	TCACCTGGCCATGTGACTTGTGGGCTTCCCTTTGTCAT CCTTCGCCTAGGGCTCTGAGCAGGGCAGGGACAGCA AAGGGGTGCTCAGTTGTCACCTCCACAGCACGGAG	289
<i>mir-212-prec</i>	CGGGGCACCCCGCCGGACAGCGCGCCGGCACCTTG GCTCTAGACTGCTTACTGCCCGGGCCGCCCTCAGTAA CAGTCTCCAGTCACGGCCACCGACGCCTGGCCCCGCC	290
<i>mir-213-prec</i>	CCTGTGCAGAGATTATTTTTTAAAAGGTCACAATCAA CATTCAATTGCTGTCGGTGGGTTGAACTGTGTGGACAA GCTCACTGAACAATGAATGCAACTGTGGCCCCGCTT	291
<i>mir-213-prec-LIM</i>	GAGTTTTGAGGTTGCTTCAGTGAACATTCAACGCTGT CGGTGAGTTTGAATTTAAAATCAAACCATCGACCGT TGATTGTACCCTATGGCTAACCATCATCTACTCC	292
<i>mir-214-prec</i>	GGCCTGGCTGGACAGAGTTGTGATGTGTCTGCCTGTC TACACTTGCTGTGCAGAACATCCGCTCACCTGTACAG CAGGCACAGACAGGCAGTCACATGACAACCCAGCCT	293
<i>mir-215-prec</i>	ATCATTAGAAATGGTATACAGGAAAATGACCTATG AATTGACAGACAATATAGCTGAGTTTGTCTGTCATTT CTTTAGGCCAATATTCTGTATGACTGTGCTACTTCAA	294
<i>mir-216-prec</i>	GATGGCTGTGAGTTGGCTTAATCTCAGCTGGCAACTG TGAGATGTTCAACAATCCCTCACAGTGGTCTCTGGG ATTATGCTAAACAGAGCAATTTCTAGCCCTCACGA	295
<i>mir-217-prec</i>	AGTATAATTATTACATAGTTTTTGTGTCGCAGATAC TGCATCAGGAACTGATTGGATAAGAATCAGTCACCAT CAGTTCCTAATGCATTGCCTTCAGCATCTAAACAAG	296
<i>mir-218-1-prec</i>	GTGATAATGTAGCGAGATTTTCTGTTGTGCTTGATCT AACCATGTGGTTGCGAGGTATGAGTAAAACATGGTTC CGTCAAGCACCATGGAACGTCACGCAGCTTCTACA	297
<i>mir-218-2-prec</i>	GACCAGTCGCTGCGGGGCTTTCCTTTGTGCTTGATCT AACCATGTGGTGGAAACGATGGAAACGGAACATGGTT CTGTCAAGCACCCGCGAAAGCACCGTCTCCTGCA	298
<i>mir-219-prec</i>	CCGCCCGGGCCGCGGCTCCTGATTGTCCAAACGCAA TTCTCGAGTCTATGGCTCCGGCCGAGAGTTGAGTCTG GACGTCCCGAGCCGCGCCCCCAAACCTCGAGCGGG	299
<i>mir-220-prec</i>	GACAGTGTGGCATTGTAGGGCTCCACACCGTATCTGA CACTTTGGGCGAGGGCACCATGCTGAAGGTGTTCATG ATGCGGTCTGGGAACTCCTCACGGATCTTACTGATG	300
<i>mir-221-prec</i>	TGAACATCCAGTCTGGGGCATGAACCTGGCATAACA ATGTAGATTTCTGTGTTTCGTTAGGCAACAGCTACATT GTCTGCTGGGTTTCAGGCTACCTGGAAACATGTTCTC	301
<i>mir-222-prec</i>	GCTGCTGGAAGGTGTAGGTACCCTCAATGGCTCAGTA GCCAGTGTAGATCCTGTCTTTCGTAATCAGCAGCTAC ATCTGGCTACTGGTCTCTGATGGCATCTTCTAGCT	302

ES 2 523 989 T3

<i>mir-223-prec</i>	CCTGGCCTCCTGCAGTGCCACGCTCCGTGATTTGAC AAGCTGAGTTGGACACTCCATGTGGTAGAGTGCAGT TTGTCAAATACCCCAAGTGCGGCACATGCTTACCAG	303
<i>mir-224-prec</i>	GGGCTTTCAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTAGTAGATG ATTGTGCATTGTTTCAAATGGTGCCCTAGTGACTAC AAAGCCC	304
<i>mir-29b-1=102-prec1</i>	CTTCTGGAAGCTGGTTTCACATGGTGGCTTAGATTTTT CCATCTTTGTATCTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTTT AGGAG	305
<i>mir-29b-2 (miR-29b-3) =102prec7.1=7.2</i>	CTTCAGGAAGCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGATTTA AATAGTGATTGTCTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTT TTGGGGG	306
<i>mir-30*=mir-097-prec-6</i>	GTGAGCGACTGTAAACATCCTCGACTGGAAGCTGTG AAGCCACAGATGGGCTTTCAGTCGGATGTTTGCAGCT GCCTACT	307
<i>mir-033b</i>	ACCAAGTTTCAGTTCATGTAAACATCCTACACTCAGC TGTAATACATGGATTGGCTGGGAGGTGGATGTTTACT TCAGCTGACTTGA	308
<i>mir-101-precursor-9 (mir- 101-3)</i>	TGCCCTGGCTCAGTTATCACAGTGCTGATGCTGTCTA TTCTAAAGGTACAGTACTGTGATAACTGAAGGATGGC A	309
<i>mir-108-1-small</i>	ACACTGCAAGAACAATAAGGATTTTTAGGGGCATTAT GACTGAGTCAGAAAACACAGCTGCCCTGAAAGTCC CTCATTITTTCTTGCTGT	310
<i>mir-108-2-small</i>	ACTGCAAGAGCAATAAGGATTTTTAGGGGCATTATG ATAGTGGAATGGAAACACATCTGCCCCAAAAGTCC CTCATTTT	311
<i>mir-123-prec-1 (mir-126- prec-1)</i>	CGCTGGCGACGGGACATTATTACTTTTGGTACGCGCT GTGACACTTCAAACTCGTACCGTGAGTAATAATGCCG CGTCCACGGCA	312
<i>mir-123-prec-2 (mir-126- prec-2)</i>	ACATTATTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAA CTCGTACCGTGAGTAATAATGCCG	313
<i>mir-129-1-prec</i>	TGGATCTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCTGTTCTCTCAA CAGTAGTCAGGAAGCCCTTACCCCAAAAAGTATCTA	314
<i>mir-129-2</i>	TGCCCTTCGCGAATCTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCTGT ACATAACTCAATAGCCGGAAGCCCTTACCCCAAAA GCATTTGCGGAGGGCG	315
<i>mir-133b-small</i>	GCCCCCTGCTCTGGCTGGTCAAACGGAACCAAGTCCG TCTTCTGAGAGGTTTGGTCCCTTCAACCAGCTACA GCAGGG	316
<i>mir-135-small-2</i>	AGATAAATCACTCTAGTGCTTTATGGCTTTTTATTCC TATGTGATAGTAATAAAGTCTCATGTAGGGATGGAA GCCATGAAATACATTGTAAAAATCA	317
<i>mir-148b-small</i>	AAGCACGATTAGCATTGAGGTGAAGTTCTGTTATAC ACTCAGGCTGTGGCTCTCTGAAAGTCAGTGCAT	318
<i>mir-151-prec</i>	CCTGTCCTCAAGGAGCTTCAGTCTAGTAGGGGATGAG ACATACTAGACTGTGAGCTCCTCGAGGGCAGG	319
<i>mir-155-prec(BIC)</i>	CTGTTAATGCTAATCGTGATAGGGGTTTTGCCTCCA ACTGACTCCTACATATTAGCATTAAACAG	320
<i>mir-156 = mir-157= mir- 141solapado</i>	CCTAACACTGTCTGGTAAAGATGGCTCCCGGGTGGGT TCTCTCGGCAGTAACCTCAGGGAGCCCTGAAAGCCA TGGAGGAC	321
<i>mir-158-small = mir-192</i>	GCCGAGACCGAGTGACACAGGGCTCTGACCTATGAAT TGACAGCCAGTGCTCTCGTCTCCCCTCTGGCTGCCAA TTCCATAGGTACAGGTATGTTTCGCTCAATGCCAGC	322
<i>mir-159-1-small</i>	TCCCGCCCCCTGTAACAGCAACTCCATGTGGAAGTGC CCACTGGTTCAGTGGGGCTGCTGTTATCTGGGGCGA GGGCCA	323
<i>mir-161-small</i>	AAAGCTGGGTTGAGAGGGCGAAAAGGATGAGGTGA CTGGTCTGGGCTACGCTATGCTGCGGCGCTCGGG	324

<i>mir-163-1b-small</i>	CATTGGCCTCCTAAGCCAGGGATTGTGGGTTTCGAGTC CCACCCGGGGTAAAGAAAGGCCGAATT	325
<i>mir-163-3-small</i>	CCTAAGCCAGGGATTGTGGGTTTCGAGTCCCACCTGGG GTAGAGGTGAAAGTTCCTTTTACGGAATTTTTT	326
<i>mir-175-small=mir-224</i>	GGGCTTTCAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTAGTAGATG ATTGTGCATTGTTTCAAATGGTGCCCTAGTGACTAC AAAGCCC	327
<i>mir-177-small</i>	ACGCAAGTGTCTAAGGTGAGCTCAGGGAGCACAGA AACCTCCAGTGGAAACAGAAGGGCAAAGCTCATT	328
<i>mir-180-small</i>	CATGTGTCACCTTTCAGGTGGAGTTTCAAGAGTCCCTT CCTGGTTCACCGTCTCCTTTGCTCTTCCACAAC	329
<i>mir-187-prec</i>	GGTCGGGCTCACCATGACACAGTGTGAGACTCGGGC TACAACACAGGACCCGGGGCGCTGCTCTGACCCCTCG TGTCTTGTGTTGCAGCCGGAGGGACGCAGGTCCGCA	330
<i>mir-188-prec</i>	TGCTCCCTCTCTCACATCCCTTGCATGGTGGAGGGTG AGCTTTCTGAAAACCCCTCCCACATGCAGGGTTTGA GGATGGCGAGCC	331
<i>mir-190-prec</i>	TGCAGGCCTCTGTGTGATATGTTTATATATTAGGTT GTTATTTAATCCAACATATATCAAACATATTCTTAC AGTGTCTTGCC	332
<i>mir-197-2</i>	GTGCATGTGTATGTATGTGTGCATGTGCATGTGTATG TGTATGAGTGCATGCGTGTGTGC	333
<i>mir-197-prec</i>	GGCTGTGCCGGGTAGAGAGGGCAGTGGGAGGTAAGA GCTCTTACCCTTACCAGCTTCTCCACCCAGCATGG CC	334
<i>mir-202-prec</i>	GTTCTTTTTTCTATGCATATACTTCTTTGAGGATCTG GCCTAAAGAGGTATAGGGCATGGGAAGATGGAGC	335
<i>mir-294-1 (chr16)</i>	CAATCTTCCTTTATCATGGTATTGATTTTTTCAGTGCTT CCCTTTTGTGTGAGAGAAGATA	336
<i>mir-hes1</i>	ATGGAGCTGCTCACCCCTGTGGGCCTCAAATGTGGAGG AACTATTCTGATGTCCAAGTGGAAAGTGCTGCGACAT TTGAGCGTCACCGGTGACGCCATATCA	337
<i>mir-hes2</i>	GCATCCCCTCAGCCTGTGGCACTCAAACCTGTGGGGGC ACTTTCTGCTCTCTGGTGAAGTGCCGCCATCTTTTGA GTGTTACCGCTTGAGAAGACTCAACC	338
<i>mir-hes3</i>	CGAGGAGCTCATACTGGGATACTCAAATGGGGGCG CTTTCTTTTTGTCTGTTACTGGGAAGTGCTTCGATTT TGGGGTGTCCCTGTTTGTAGTAGGGCATC	339
<i>mir-29b-1</i>	CTTCAGGAAGCTGGTTTCATATGGTGGTTTATGATTTA AATAGTGATTGTCTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTT TTGGGGG	340
* Una secuencia subrayada en una secuencia precursora representa una transcripción miR procesada (microARN maduro). Todas las secuencias son humanas.		

Métodos de diagnóstico y pronóstico

5 Los cánceres asociados a BCL2 se pueden diagnosticar y pronosticar detectando una reducción de la cantidad de producto génico miR en una muestra con respecto a una muestra control, una reducción del número de copias génicas miR, o detectando mutaciones en una o más copias de un gen miR, en el que el gen miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica de BCL2 (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Una reducción en el número de copias génicas miR de un gen miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2, de diploide a haploide, o que no haya copias, es diagnóstico o pronóstico de cánceres asociados a BCL2. De la misma manera, una mutación en una o ambas copias de un gen miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2 implica una pérdida de función génica, y es diagnóstica o pronóstica de cánceres asociados a BCL2.

15 Como se utiliza en el presente documento, una “célula CLL” puede ser un linfocito de un sujeto que tiene o es sospechoso de tener, CLL, en el que el linfocito tiene una “Puntuación CLL” de al menos 4, como se determina

según el sistema de puntuación de Matutes y col., *Leukemia* 8(10):1640-1645 (1994). Como se utiliza en el presente documento, una “célula de cáncer de próstata” puede ser una célula neoplásica o tumorigénica de origen prostático, localizada en la próstata o no. Otras células de cáncer asociado con BCL2 son conocidas por los expertos en la técnica y/o se describen en el presente documento.

5 Las secuencias de ácidos nucleicos de los genes miR15 y miR16 están contenidos en el clon 317g11, la secuencia de nucleótidos se da en el GenBank con el nº de registro AC069475. Se puede detectar una eliminación o mutación en un gen miR que comprende una secuencia de nucleótidos que sea complementaria a la secuencia de nucleótidos de la transcripción génica BCL2 determinando la estructura o secuencia del gen en el tejido de un sujeto sospechoso de tener un cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, CLL, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, melanoma, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma no Hodgkin, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, enfermedades hematológicas malignas, tumores sólidos, cáncer colorrectal, carcinoma cerebral, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, enfermedad linfoproliferativa asociada al virus de Epstein-Barr, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular y carcinoma gástrico), y comparando esta estructura o secuencia con los genes en una muestra o tejido no afectado del sujeto, o en una muestra de tejido de un control normal. Tal comparación se puede hacer por cualquier técnica adecuada (por ejemplo, como la que se describe en el presente documento).

20 Para diagnosticar un cáncer asociado con BCL2, la muestra de tejido puede derivarse de un sujeto. La muestra entonces se puede preparar para la determinación de la expresión del producto génico miR o la eliminación o mutación de uno o más genes miR. Las muestras de tejido adecuadas incluyen, pero no se limitan a estas, una biopsia de interés, así como una muestra de sangre y/o fluidos.

25 Como se utiliza en el presente documento, un “cáncer asociado con BCL2” es un cáncer que se asocia con la sobre-expresión de un gen BCL2 o un producto génico, que puede ser cualquier cáncer que se caracteriza por células que expresan altos niveles de uno o más productos génicos BCL2, con respecto a las células de control adecuadas. Las células de control adecuadas pueden ser células de un individuo que no está afectado por un cáncer que sobre-expresa Bcl2, o pueden ser células no cancerosas del individuo a diagnosticar, o pueden ser células no cancerosas de otro individuo que está afectado por un cáncer que sobre-expresa Bcl2.

30 La presencia de eliminaciones o mutaciones génicas miR se pueden detectar por hibridación de transferencias de Southern del ADN genómico de un sujeto, utilizando sondas para genes miR, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una muestra de tejido se puede retirar de un sujeto sospechoso de tener un cáncer asociado con BCL2 por técnicas de biopsia convencionales. De manera alternativa, se puede obtener una muestra de sangre de un sujeto sospechoso de tener un cáncer asociado con BCL2, y se pueden aislar los glóbulos blancos para la extracción del ADN. La sangre o la muestra de tejido se pueden obtener del paciente antes de iniciar la radio o quimioterapia. Se puede obtener una muestra correspondiente de sangre o tejido a partir de tejidos sin afectar del sujeto, o a partir de un individuo humano normal, para utilizarla como control.

40 Las técnicas de hibridación de transferencia de Southern están dentro de la experiencia de la técnica. Por ejemplo, el ADN genómico aislado de un tejido o fluido (por ejemplo, la sangre) de un sujeto sospechoso de tener un cáncer asociado con BCL2 se puede digerir por endonucleasas de restricción. Esta digestión genera fragmentos de restricción del ADN genómico que se pueden separar por electroforesis, por ejemplo, en gel de agarosa. Los fragmentos de restricción se transfieren entonces a una membrana de hibridación (por ejemplo, de nitrocelulosa o nylon), y se hibridan con sondas marcadas específicas para uno o más genes miR (por ejemplo, un gen miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2). Se indica una eliminación o mutación de uno o más genes por una alteración de los patrones del fragmento de restricción en la membrana de hibridación, cuando se compara con el ADN de una muestra de control que se ha tratado de manera idéntica a la muestra de ADN del sujeto. El marcado de la sonda y las condiciones de hibridación puede determinarlos un experto habituado en la técnica. El término “eliminación”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una eliminación parcial de un gen o a la eliminación del gen completo.

50 Por ejemplo, las sondas de ácidos nucleicos miR-15a y miR-16-1 para la hibridación de transferencia de Southern se pueden diseñar basándose en la secuencia publicada de los miARN miR-15a y miR-16-1, que se describe en Lagos-Quintana y col., *Science* 294:853-858 (2001). La secuencia de nucleótidos del microARN miR-15a es uagcagcacaauaugguug (SEC ID Nº 3). La secuencia de nucleótidos del microARN miR-16-1 es uagcagcagcaauaugggcg (SEC ID Nº 4). Las sondas adecuadas para detectar los ADN miR-15a y miR-16-1 son respectivamente:

60 CACAAACCATTATGTGCTTGCTA (SEC ID Nº 5)

GCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEC ID Nº 6)

65 Las complementarias de la SEC ID Nº 5 y la SEC ID Nº 6 también se pueden utilizar como sondas para los ADN miR-15a y miR-16-1. Otras sondas adecuadas para detectar miR-15a, miR-16-1 u otros genes miR (por ejemplo, genes miR que comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2) puede determinarlos fácilmente un experto en la técnica.

Los métodos para la preparación de sondas marcadas de ADN y ARN, y las condiciones de hibridación de las mismas para hibridar secuencias de nucleótidos, se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11.

Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico se puede marcar, por ejemplo, con un radionúclido, tal como ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , o ^{35}S ; un metal pesado; o un ligando capaz de funcionar como un miembro de una pareja de unión con un ligando marcado (por ejemplo, biotina, avidina o un anticuerpo), una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una enzima o similares.

Las sondas se pueden marcar para una actividad específica alta bien por el método de traducción nick de Rigby y col., *J. Mol. Biol.* 113:237-251 (1977) o por el método de cebamiento aleatorio de Fienberg y col., *Anal. Biochem.* 132:6-13 (1983). Este último es el método de elección para sintetizar sondas marcadas con ^{32}P de actividad específica alta de matrices de ADN monocatenario o de ARN. Por ejemplo, reemplazando nucleótidos pre-existentes con nucleótidos altamente radioactivos según el método de traducción nick, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas con ^{32}P con una actividad específica muy en exceso de 10^8 cpm/microgramo. Entonces se puede llevar a cabo la detección autorradiográfica de la hibridación exponiendo los filtros hibridados a una película fotográfica. La exploración densitométrica de las películas fotográficas expuestas por los filtros hibridados proporcionan una medición precisa del número de copias génicas de miR15 o miR16. De manera alternativa, el número de copias génicas de miR15 o miR16 se puede cuantificar por sistemas de imagen computarizadas, tales como Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager que está disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Cuando no es práctico el marcado con radionúclidos de las sondas ADN o ARN, se puede utilizar el método del cebador aleatorio para incorporar un análogo de nucleótido (por ejemplo, el análogo dTTP, trifosfato de 5-(N-(N-biotinil-epsilon-aminocaproil)-3-aminoalil) desoxiuridina) en la molécula de la sonda. El oligonucleótido biotinilado de la sonda se puede detectar por reacción con proteínas que se unen a la biotina, tales como avidina, estreptavidina, o anticuerpos anti-biotina, acoplados a colorantes fluorescentes o enzimas que producen reacciones coloreadas.

También se pueden detectar eliminaciones o mutaciones de los genes miR amplificando un fragmento de estos genes por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y analizando el fragmento amplificado por secuenciación o por electroforesis para determinar si la secuencia y/o la longitud del fragmento amplificado de una muestra de ADN de un sujeto es diferente de la de una muestra de ADN control. La reacción adecuada y las condiciones de ciclado para la amplificación de fragmentos de ADN se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica. Una reacción PCR y condiciones de ciclado adecuadas se proporcionan en los métodos descritos en los Ejemplos, posteriormente.

El diagnóstico de un cáncer asociado con BCL2 se puede llevar a cabo detectando eliminaciones de genes miR (por ejemplo, genes miR que comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2). Por ejemplo, la detección de miR entre varios marcadores cromosómicos, tales como los marcadores indicados en las FIG. 2A-2D. Por ejemplo, una eliminación en la región 13q14 entre los microsatélites marcadores D13S272 y D13S273 que comprende los miR-15a y miR-16-1, puede indicar la presencia de un cáncer asociado con BCL2. Además, cuando la eliminación en 13q14 es entre los microsatélites marcadores D13S1150 y D13S272 o entre el locus Alu18 y el microsatélite marcador D13S272, donde se han eliminado miR15 o miR16, se puede indicar la presencia de un cáncer asociado con BCL2.

Un método alternativo para determinar el número de copias de un gen miR que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2 (por ejemplo, genes miR-15a y miR-16-1) por genoma diploide en una muestra de tejido se basa en el hecho de que el grupo génico miR-15a/miR-16-1 se localiza en 13q14, y está unido a los marcadores D13S272 y D13S273. La pérdida de una copia de los genes miR-15a o miR-16-1 en un individuo que es heterocigoto en un locus ligado a los marcadores D13S272 y D13S273 se puede deducir por la pérdida de heterocigosidad en estos marcadores. Los métodos para determinar la pérdida de heterocigosidad de los marcadores cromosómicos están dentro de la experiencia de la técnica. Un estudio ejemplar de pérdida de heterocigosidad se describe en el Ejemplo 3 posteriormente.

Otra técnica para determinar si uno o más genes miR de un sujeto sospechoso de tener un cáncer asociado con BCL2 ha mutado es el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), por ejemplo, como la que describe Orita, y col., *Genomics* 5: 874-879 (1989) y Hayashi, *PCR Methods and Applic.* 1: 34-38 (1991). La técnica SSCP consiste en la amplificación de un fragmento del gen de interés (por ejemplo, un gen miR) por PCR; desnaturizar el fragmento y realizar la electroforesis de las dos cadenas sencillas desnaturizadas bajo condiciones no desnaturizantes. Las cadenas simples asumen una estructura secundaria intracatenaria dependiente de secuencia compleja que afecta la movilidad electroforética de las cadenas.

Una eliminación o mutación de uno o más genes miR también puede producir una reducción en la expresión de estos genes miR. Por lo tanto, un cáncer asociado con BCL2 se puede diagnosticar también detectando los niveles de expresión del ARN producido por uno o más genes miR (por ejemplo, un gen miR que comprende una secuencia

de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2), en donde una reducción en la expresión génica de miR es diagnóstica de un cáncer asociado con BCL2.

Los genes miR se transcriben para producir un ARN precursor que forma una estructura vástago-lazo. El ARN precursor no se traduce en una proteína, sino que se procesa en un "micro ARN" o "miARN", que se cree que es el producto génico funcional.

Como se utiliza en el presente documento, un "producto génico miR" significa las transcripciones en ARN procesado o sin procesar a partir de un gen miR, como se describe por completo posteriormente. Las expresiones "ARN", "transcripciones de ARN" y "producto génico", se utilizan en el presente documento de manera intercambiable en el contexto de la expresión génica de miR.

Por ejemplo, los ARN precursores miR-15a y miR-16-1 se describen en Lagos-Quintana, y col., Science 294, 853-858 (2001). Las secuencias de los ARN precursores miR-15a y miR-16-1 se dan en las SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2. Las antedichas estructuras vástago-lazo de las SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, se muestran en las FIG. 1 A y 1B, respectivamente.

[SEC ID N° 1]

ccuuggaguaaaguagcagcacauaaugguuuggauuuugaaaaggugcaggccauuuugucug

ccucaaaaauacaagg

[SEC ID N° 2]

gucgcagugccuagcagcacguaaaauuggcguuaagauucuaaaauuucuccaguauuaacug

ugcugcugaaguaagguugac

Sin el deseo de quedar ligado por teoría alguna, se piensa que los ARN precursores de miR-15a y miR-16-1 se co-expresan a partir del agrupamiento génico miR-15a/miR-16-1, y se procesan por el complejo Dicer/Argonauta en productos miARN funcionales. Véase, por ejemplo, Lee y col., Science 294:862 (2001). Ambos productos miARN funcionales de estos genes son moléculas de ARN monocatenario de 22 nucleótidos de longitud que tienen un extremo 5' monofosfato y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. La secuencia de nucleótidos del micro ARN procesado miR-15a es uagcagcacuaaugguuug (SEC ID N° 3). La secuencia de nucleótidos del microARN procesado miR-16-1 es uagcagcacguaaaauuggcg (SEC ID N° 4). Las moléculas de ARN precursor de 60-70 nt producidas a partir de los genes miR-15a o miR-16-1 se pueden detectar. De manera alternativa se pueden detectar los productos génicos cortos microARN miR-15a y miR-16-1, que se producen por medio del procesamiento de los ARN precursores por las proteínas Dicer y Argonauta.

Los métodos para determinar los niveles de expresión de ARN están dentro de la experiencia de la técnica. Por ejemplo, una muestra de tejido o de sangre de un sujeto sospechoso de tener un cáncer asociado con BCL2 se obtiene como se describe en el presente documento. Como control, se puede obtener una muestra correspondiente de tejido o sangre de tejidos sin afectar del sujeto, o de un individuo humano normal, como se ha descrito en el presente documento. La muestra control de tejido o sangre se procesa entonces junto con la muestra del sujeto. Los niveles de la expresión génica de miR (por ejemplo, un gen miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la transcripción génica BCL2) en el sujeto se puede entonces comparar con la del tejido sin afectar del sujeto, o con el nivel de expresión de miR en el tejido o sangre del control normal. Por ejemplo, el nivel relativo de expresión de miR en células de cáncer asociado con BCL2 se determina convenientemente con respecto a una o más referencias. Las referencias pueden comprender, por ejemplo, un nivel de expresión cero por una parte, y el nivel de expresión del gen en el tejido normal del mismo paciente, o el nivel de expresión en el tejido de un grupo de control normal por la otra. La referencia puede también comprender el nivel de expresión de miR en una línea celular de referencia. La magnitud de la disminución de la expresión de miR, comparada con los niveles de expresión normales, puede ser indicativa del resultado clínico futuro después del tratamiento.

De manera alternativa, los niveles de la expresión génica de miR (por ejemplo, un gen miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la transcripción génica BCL2) en un sujeto sospechoso de tener un cáncer asociado con BCL2 se puede comparar con los niveles medios de la expresión génica de miR obtenida previamente de una población de controles humanos normales.

Las técnicas adecuadas para la determinación del nivel de transcripciones ARN de un gen en particular en las células se conocen bien por los expertos en la técnica. Según uno de tales métodos, se puede purificar el ARN celular total a partir de las células por homogenización en presencia de un tampón de extracción de ácido nucleico, seguida por centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan, y se retira el ADN por tratamiento con DNasa y precipitación. Se separan entonces las moléculas de ARN por electroforesis en gel sobre geles de agarosa según

técnicas de referencia, y se transfieren a filtros de nitrocelulosa, por ejemplo, utilizando la técnica denominada transferencia de "Northern". El ARN se inmoviliza entonces en los filtros por calor. La detección y cuantificación del ARN específico se consigue utilizando sondas de ADN o ARN marcados complementarios al ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7. Unas sondas adecuadas para hibridación con transferencia de Northern de ARN miR-15a o miR-16-1 incluyen por ejemplo, las SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6.

La detección autorradiográfica de la hibridación de la sonda con el ARN miR se puede llevar a cabo exponiendo los filtros hibridados a la película fotográfica. La exploración densitométrica de las películas fotográficas expuestas por los filtros hibridados proporciona una media precisa de los niveles de ARN transcrito. De manera alternativa, los niveles de ARN transcrito se pueden cuantificar por imágenes computarizadas de la transferencia de la hibridación, por ejemplo, con el Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager que está disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Además de Northern y otras técnicas de hibridación con transferencia de ARN, la determinación de los niveles de transcripciones de ARN se pueden llevar a cabo según la técnica de hibridación *in situ*. Esta técnica necesita menos células que la técnica de transferencia de Northern, e implica depositar células enteras en un portaobjetos de microscopio y sondar el contenido en ácido nucleico de la célula con una solución que contiene sondas de oligonucleótidos radioactivos o marcados de otra manera (por ejemplo, ADNc o ARNc). Esta técnica es particularmente adecuada para analizar muestras de tejido de biopsias de sujetos sospechosos de tener un cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, CLL, cáncer de próstata). La práctica de la técnica de hibridación *in situ* se describe con más detalles en la Patente de EE. UU. n° 5.427.916. Las sondas adecuadas para la hibridación *in situ* de ARN miR-15a o miR-16-1 incluyen, por ejemplo, las SEC ID N° 5 y la SEC ID N° 6.

El número relativo de una transcripción miR en particular se puede determinar también por transcripción inversa de la transcripción miR, seguido por la amplificación en una reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR). Los niveles de una transcripción miR pueden determinarse por comparación con una referencia interna, por ejemplo, los niveles de ARNm de un gen "constitutivo" presente en la misma muestra. Los genes "constitutivos" adecuados para su uso como referencias internas incluyen, por ejemplo, miosina y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los métodos para la RT-PCR cuantitativa y las variaciones de la misma se conocen bien por los expertos en la técnica.

Otras técnicas de medición de la expresión de la transcripción de un gen miR también se conocen por los expertos en la técnica e incluyen varias técnicas para la medición de las tasas de transcripciones de ARN y degradación.

Métodos de tratamiento

Se puede tratar un cáncer asociado con BCL2 administrando un producto génico aislado de uno o más de los genes miR (por ejemplo, un gen miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2), sea solo o en combinación, a una célula de un cáncer asociado con BCL2.

En particular, se puede tratar un cáncer asociado con BCL2 administrando el producto génico aislado de uno o más genes miR, sea solo o en combinación, a una célula cancerosa.

Como se utiliza en el presente documento, una "célula de un cáncer asociado con BCL2" es una célula tumorigénica o neoplásica, que se puede aislar de un sujeto que padece un cáncer asociado con BCL2. Una célula de un cáncer asociado con BCL2 se puede identificar detectando un aumento del nivel de expresión de un producto génico BCL2 en una célula, con respecto a una célula de control normal, o detectando un fenotipo canceroso o neoplásico en la célula. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente células con un fenotipo canceroso o neoplásico. Por ejemplo, tales células son insensibles a la inhibición del crecimiento por el contacto en un cultivo, y formarán focos cuando se cultivan por periodos extensos. Las células cancerosas o neoplásicas también muestran cambios morfológicos característicos, patrones de crecimiento de colonia desorganizado y adquisición de crecimiento independiente del anclaje. Las células cancerosas o neoplásicas también tienen la capacidad de formar tumores invasivos en animales susceptibles, que se pueden evaluar por inyección de las células, por ejemplo, en ratones atímicos utilizando técnicas dentro de la experiencia de la técnica.

Como se utiliza en el presente documento, un producto génico "aislado" es el que se altera o se retira de su estado natural por medio de la intervención humana. Por ejemplo, un ARN presente naturalmente en un animal vivo, no está "aislado". Un ARN sintético, o un ARN separado parcial o completamente de los materiales coexistentes en su estado natural, está "aislado". Un ARN aislado puede existir en una forma sustancialmente purificada, o puede existir en una célula en la que se ha suministrado el ARN. Por lo tanto, un producto génico miR que se ha suministrado deliberadamente a, o se expresa en, una célula (por ejemplo, una célula de un cáncer asociado con BCL2) se considera un producto génico "aislado".

Los productos génicos miR se pueden obtener utilizando varias técnicas de referencia. Por ejemplo, los productos génicos se pueden sintetizar químicamente o de manera recombinante utilizando métodos conocidos en la técnica. Los productos ARN se pueden sintetizar utilizando fosforamiditas de ribonucleósidos protegidas apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los suministradores comerciales de moléculas sintéticas de ARN o reactivos de síntesis incluyen, por ejemplo, Prologo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE. UU.), Pierce Chemical (filial de Perbio Science, Rockford, IL, EE. UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE. UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE. UU.) y Cruachem (Glasgow, RU).

De manera alternativa, uno o más productos génicos miR se pueden expresar a partir de plásmidos de ADN lineales o circulares utilizando un promotor adecuado. los promotores adecuados para expresar ARN a partir de plásmidos incluyen las secuencias promotoras U6 o H1 ARN pol III, o los promotores de citomegalovirus (CMV). La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia de la técnica. Tales plásmidos recombinantes también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de uno o más productos génicos miR en las células (por ejemplo, células de cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, células de CLL, células de cáncer de próstata, otras células cancerosas)).

Los productos génicos miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes se pueden aislar de cultivos de sistemas de expresión celular por técnicas de referencia. Los productos génicos miR que se expresan de plásmidos recombinantes se pueden también suministrar a, y expresar directamente en, células cancerosas (por ejemplo, células de CLL, células de cáncer de próstata, otras células cancerosas)). El uso de plásmidos recombinantes para suministrar los productos génicos miR a las células cancerosas se trata posteriormente con más detalle.

Se pueden expresar múltiples productos génicos miR a partir de plásmidos recombinantes por separado, o se pueden expresar del mismo plásmido recombinante. Se puede expresar el uno o más productos génicos miR como moléculas de ARN precursor a partir de un solo plásmido, y las moléculas precursoras se procesan en moléculas funcionales de miARN por un sistema de procesamiento adecuado. Los sistemas de procesamiento adecuados incluyen, por ejemplo, el sistema de lisado celular de *Drosophila* in vitro, descrito en la Solicitud de Patente Publicada de EE. UU. Nº 2002/0086356, de Tuschl y col.

La selección de plásmidos adecuados para expresión del producto génico miR, los métodos para la inserción de las secuencias de ácido nucleico que expresan el producto génico miR en el plásmido, y los métodos de suministro de un plásmido recombinante a las células de interés se encuentran dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Zeng, y col., *Molecular Cell* 9:1327-1333 (2002); Tuschl, *Nat. Biotechnol.* 20:446-448 (2002); Brummelkamp, y col., *Science* 296:550-553 (2002); Miyagishi, y col., *Nat. Biotechnol.* 20:497-500 (2002); Paddison, y col., *Genes Dev.* 16:948-958 (2002); Lee, y col., *Nat. Biotechnol.* 20:500-505 (2002); y Paul, y col., *Nat. Biotechnol.* 20: 505-508 (2002).

Un plásmido que exprese un producto(s) génico(s) miR puede comprender una secuencia que codifique el ARN precursor del miR bajo el control del promotor precoz intermedio de citomegalovirus (CMV). Como se utiliza en el presente documento, "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican el producto miARN se localizan 3' del promotor, de tal forma que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias que codifican el miARN.

Los productos génicos miR también se pueden expresar a partir de vectores víricos recombinantes. Se contempla que el producto(s) génico(s) miR se pueden expresar de dos vectores víricos recombinantes por separado, o a partir del mismo vector vírico. El ARN expresado a partir de vectores víricos recombinantes se pueden aislar de cultivos de sistemas celulares de expresión por técnicas de referencia, o se pueden expresar directamente en células de cáncer asociado con BCL2. El uso de vectores víricos recombinantes para suministrar el producto(s) génico(s) miR a las células del cáncer asociado con BCL2 se trata posteriormente con más detalle.

Los vectores víricos recombinantes comprenden secuencias que codifican uno o más productos génicos miR y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias de ARN. Como se describe en el presente documento, los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras U6 o H1 ARN pol III, o los promotores del citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia de la técnica. Los vectores víricos recombinantes también pueden incluir promotores inducibles o regulables para la expresión de uno o más productos génicos miR en una célula del cáncer asociado con BCL2.

Se puede utilizar cualquier vector vírico capaz de aceptar una secuencia de nucleótidos que codifique un producto génico miR; por ejemplo, los vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rhabdovirus, virus de leucemia murina); herpesvirus, y similares. Se puede modificar también el tropismo de los vectores víricos seudotipando los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus. Por ejemplo, un vector AAV se puede seudotipar con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola, y similares. La selección de vectores víricos recombinantes, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar ARN en el vector, los métodos para el suministro del vector vírico a las células de interés, y la recuperación de los productos ARN están dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg, *Gene Therap.* 2:301-310 (1995); Eglitis, *Biotechniques* 6:608-614 (1988);

Miller, Hum. Gene Therap. 1:5-14 (1990); y Anderson, Nature 392:25-30 (1998).

Los vectores víricos preferidos son los derivados de AV y AAV. Un vector AV adecuado para la expresión del miARN, un método para la construcción del vector recombinante AV, y un método para el suministro del vector en las células diana, se describen en Xia, y col., Nat. Biotech. 20:1006-1010 (2002). Los vectores adecuados AAV para la expresión del miARN, los métodos para la construcción del vector recombinante AAV, y los métodos de suministro de los vectores en las células diana se describen en Samulski, y col., J. Virol. 61:3096-3101 (1987); Fisher, y col., J. Virol., 70:520-532 (1996); Samulski, y col., J. Virol. 63:3822-3826 (1989); Patente de EE. UU. N° 5.252.479; Patente de EE. UU. N° 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional N° WO 93/24641. Uno o más productos génicos miR se pueden expresar de un solo vector recombinante AAV que comprende el promotor precoz intermedio CMV.

Un vector vírico recombinante AAV puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor de miR en conexión operativa con una secuencia de terminación poliT bajo el control de un promotor ARN U6 humano. Como se utiliza en el presente documento, "en conexión operativa con una secuencia de terminación poliT" significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas en sentido o antisentido están inmediatamente adyacentes a la señal de terminación poliT en la dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias miR a partir del vector, las señales de terminación poliT actúan para terminar la transcripción.

Se pueden utilizar uno o más productos génicos miR para inhibir el crecimiento neoplásico o tumorigénico de células del cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, células de CLL, células de cáncer de próstata, células de otros cánceres). Sin el deseo de quedar ligado por teoría alguna, se cree que los miARN procesados se unen a secuencias complementarias en uno o más ARNm diana que son necesarios para iniciar y/o mantener el crecimiento neoplásico o tumorigénico en estas células. Por lo tanto, se desvela en el presente documento un método para tratar un cáncer asociado con BCL2, por ejemplo, CLL, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, melanoma, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma no Hodgkin, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, enfermedades hematológicas malignas, tumores sólidos, cáncer colorrectal, carcinoma cerebral, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, enfermedad linfoproliferativa asociada al virus de Epstein-Barr, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular, y carcinoma gástrico, en un sujeto que necesita tal tratamiento. El método comprende la administración de una cantidad eficaz de uno o más productos génicos miR al sujeto, tal que se inhiba la proliferación de las células del cáncer asociado con BCL2.

Por ejemplo, la expresión de uno o más genes miR puede estar reducida o ausente en las células neoplásicas o tumorales primarias o metastásicas de cánceres de al menos los siguientes subtipos histológicos: sarcoma (cánceres del tejido conectivo y otro tejido de origen mesodérmico); melanoma (cánceres que derivan de los melanocitos pigmentados); carcinoma (cánceres de origen epitelial); adenocarcinoma (cánceres de origen epitelial glandular); cánceres de origen neural (glioma/glioblastoma y astrocitoma); y neoplasias hematológicas, tales como leucemias y linfomas (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica crónica, CLL).

La expresión del uno o más genes miR también puede estar reducida o ausente en cánceres que tienen su origen en al menos los siguientes órganos o tejidos, independientemente del subtipo histológico: mama; tejidos del sistema urogenital masculino o femenino (por ejemplo, uréter, vejiga, próstata, testículos, ovario, cuello uterino, útero, vagina); pulmón; tejidos del sistema gastrointestinal (por ejemplo, estómago, intestino grueso y delgado, colon, recto); glándulas exocrinas tales como páncreas y glándulas adrenales; tejidos de la boca y esófago; cerebro y médula espinal; riñón (renal); páncreas; sistema hepatobiliar (por ejemplo, hígado, vesícula biliar); sistema linfático; músculo liso y estriado; hueso y médula ósea; piel; y tejidos del ojo.

La expresión de uno o más genes miR también pueden estar reducida o ausente en cánceres o tumores en cualquier estadio de desarrollo pronóstico, por ejemplo, como se mide por los sistemas de estadificación por "Agrupamientos de Estado Total" (también llamado "de Numeración Romana") o "Tumor, Ganglios, y Metástasis" (TNM). Los sistemas de estadificación pronóstica apropiados y las descripciones de estadios para un cáncer determinado se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en el sitio de internet del Instituto Nacional del Cáncer "CancerNct".

Un sujeto que tiene la necesidad de tratamiento para un cáncer asociado con BCL2 se puede identificar obteniendo una muestra de células tumorales o neoplásicas (o células sospechosas de ser tumorales o neoplásicas) del sujeto, y determinando si la expresión de uno o más genes miR (por ejemplo genes miR que comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción BCL2) está reducida o ausente en al menos una parte de las células, cuando se compara con las células de un tejido normal obtenidas del sujeto (por ejemplo, células control). Los métodos para detectar los niveles de expresión génica de miR en las células se encuentran dentro de la experiencia de la técnica y se describen en el presente documento. De manera alternativa, la expresión de uno o más productos génicos de miR en las células obtenidas de un sujeto se pueden comparar con los niveles de expresión medios de estos genes en las células obtenidas de una población de sujetos normales. Un sujeto que tiene necesidad de tratamiento para un cáncer asociado con BCL2 puede identificarlo fácilmente un médico utilizando técnicas de diagnóstico de referencia. Véase, por ejemplo, "Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. International Workshop on Chronic

Lymphocytic Leukemia," (1989) *Annals of Internal Medicine* 110(3):236-238. Por ejemplo, los sujetos con CLL muestran células de CLL circulantes, linfocitosis (es decir, un recuento de linfocitos en la sangre igual o superior a 10.000 células por milímetro cúbico), y una acumulación progresiva de células de CLL en la médula ósea y los tejidos linfáticos.

5 Se puede confirmar la identidad de células de cáncer asociado con BCL2 en la sangre u otro tejido de un sujeto por observación visual directa de una muestra de sangre, y/o en el caso de CLL, determinando la "puntuación CLL" de linfocitos. La puntuación CLL indica la presencia o ausencia de cinco marcadores de superficie de linfocitos característicos de las células de CLL: CD5+, CD23+, FMC7-, y expresión débil (+/-) de inmunoglobulina de superficie (Smlg) y CD22. Este sistema de puntuación da un valor de 1 o 0 para cada uno de estos cinco marcadores según si es típico o atípico para CLL. Las células CLL tienen una puntuación CLL de 4 o 5, mientras que los linfocitos de otras leucemias tienen una puntuación CLL de <1 a 3. Véase Matutes, y col., *Leukemia* 8(10):1640-1645 (1994) y Moreau, y col., *American Journal of Clinical Pathology*, 108:378-82 (1997). Las células de CLL también tienen niveles relativamente bajos de inmunoglobulina de superficie al compararse con las células B normales de sangre periférica. Los niveles de inmunoglobulina de superficie en los linfocitos se pueden detectar fácilmente según técnicas de referencia; véase por ejemplo, Rozman, y col., *New England Journal of Medicine* 333:1052-1057 1995).

20 Como se utiliza en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un producto génico miR es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula de un cáncer asociado con BCL2 en un sujeto que padece un cáncer asociado con BCL2. Como se utiliza en el presente documento, "inhibir la proliferación de una célula de un cáncer asociado con BCL2" significa destruir la célula, o detener permanente o temporalmente el crecimiento de la célula. La inhibición de una célula de un cáncer asociado con BCL2 se puede deducir si el número de tales células en el sujeto permanece constante o desciende tras la administración de un producto génico miR. Una inhibición de la proliferación de una célula de un cáncer asociado con BCL2 también se puede deducir si el número absoluto de tales células aumenta, pero la tasa de crecimiento tumoral disminuye.

El número de células de un cáncer asociado con BCL2 en el cuerpo de un sujeto se puede determinar por medición directa o por estimación del tamaño de masas tumorales primarias o metastáticas.

30 Por ejemplo, el número de células de un cáncer asociado con BCL2 en un sujeto se puede determinar fácilmente utilizando un recuento celular en sangre completa o de glóbulos blancos. El número de células de un cáncer asociado con BCL2 también se puede determinar fácilmente por métodos inmunohistológicos, citometría de flujo, u otras técnicas diseñadas para detectar los marcadores de superficie característicos de las células de un cáncer asociado con BCL2.

35 El tamaño de una masa tumoral se puede determinar por observación visual directa, o por métodos de diagnóstico por imagen, tales como rayos X, resonancia magnética (MRI), ultrasonidos, y escintigrafía. Los métodos de diagnóstico por imagen que se utilizan para determinar el tamaño de una masa tumoral se pueden emplear con o sin agentes de contraste, como se conoce en la técnica. El tamaño de la masa tumoral se puede determinar también por medios físicos, como la palpación de la masa de tejido o midiendo la masa de tejido con un instrumento de medida tal como un calibre.

45 Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de uno o más productos génicos de miR que se va a administrar a un sujeto dado, tomando en cuenta factores, tales como el tamaño y el peso del sujeto; la extensión de la penetración de la enfermedad; la edad, salud y sexo del sujeto; la vía de administración; y si la administración es local o sistémica.

50 Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico miR se puede basar en el peso aproximado de una masa tumoral a tratar. El peso aproximado de una masa tumoral se puede determinar calculando el volumen aproximado de la masa, en la que un centímetro cúbico de volumen es más o menos equivalente a un gramo. Una cantidad eficaz de uno o más productos génicos de miR, basada en el peso de una masa tumoral, puede ser al menos aproximadamente 10 microgramos/gramo de masa tumoral, y puede estar entre aproximadamente 10-500 microgramos/gramo de masa tumoral. Además, la cantidad eficaz puede ser al menos aproximadamente 60 microgramos/gramo de masa tumoral o al menos aproximadamente 100 microgramos/gramo de masa tumoral. Una cantidad eficaz basada en el peso de la masa tumoral se inyecta directamente en el tumor.

60 Una cantidad eficaz de uno o más productos génicos de miR se puede basar también en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto que se va a tratar. Tales cantidades eficaces se pueden administrar por vía enteral o parenteral, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz de uno o más productos génicos de miR administrada a un sujeto puede variar entre aproximadamente 5-3000 microgramos/kg de peso corporal, y puede estar entre aproximadamente 700-1000 microgramos/kg de peso corporal, y también puede ser mayor de aproximadamente 1000 microgramos / kg de peso corporal.

65 Un experto en la técnica puede fácilmente determinar un régimen de dosificación adecuado para la administración de uno o más productos génicos miR para un sujeto dado. Por ejemplo, se puede administrar uno o más productos génicos miR al sujeto una vez (por ejemplo, como inyección única o de depósito). De manera alternativa, el uno o

más productos génicos de miR se pueden administrar una o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más preferentemente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación particular, el uno o más productos génicos de miR se administran una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz de uno o más productos génicos de miR que se administran al sujeto puede comprender la cantidad total del producto génico administrado durante el régimen de dosificación completo.

Se puede administrar uno o más productos génicos de miR a un sujeto por medios adecuados para el suministro de los productos génicos a las células del sujeto, tal como las células madre hematopoyéticas (HSC) y/o células de un cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, células CLL, células de cáncer de próstata, células de otros cánceres). Por ejemplo, se puede administrar uno o más productos génicos de miR por métodos adecuados para transfectar las células del sujeto con el producto génico miR, o con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un producto génico miR. Las células se pueden transfectar directamente con uno o más productos génicos de miR (ya que estos son ácidos nucleicos), o se pueden transfectar con ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican el uno o más productos génicos de miR, como se describe en el presente documento.

Los métodos de transfección para células eucariotas son bien conocidos en la técnica, e incluyen la inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de una célula; electroporación, transferencia por liposomas o transferencia mediada por materiales lipofílicos; suministro de ácido nucleico mediado por receptor, biobalística o aceleración de partículas; precipitación por fosfato cálcico, y transfección mediante vectores víricos.

Por ejemplo, se pueden transfectar las células con un compuesto de transferencia liposómico, por ejemplo, DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloxo) propil]-N,N,N-trimetil-amonio metilsulfato, Boehringer - Mannheim) o un equivalente, tal como LIPOFECTINA. La cantidad de ácido nucleico utilizado no es crítica; se pueden alcanzar resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico / 10^5 células. Por ejemplo, se puede utilizar una relación de aproximadamente 0,5 microgramos de vector plásmido en 3 microgramos de DOTAP por 10^5 células.

Las células de un cáncer asociado con BCL2, por ejemplo, CLL o células de cáncer prostático, se pueden aislar de un sujeto, transfectarse con un ácido nucleico que codifica un producto génico miR, y reintroducirse en el sujeto. Las células transfectadas y reimplantadas pueden ser células CLL. Las células transfectadas y reimplantadas pueden ser HSC de un sujeto que se ha diagnosticado de un cáncer asociado con BCL2.

Las técnicas para aislar células de un cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, las células de CLL) de un sujeto se encuentran en la experiencia de la técnica, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos posteriormente. Las técnicas de aislamiento, identificación, separación y cultivo de HSC de un sujeto también están en la experiencia de la técnica, por ejemplo, como se desvela en las Pat. de EE. UU. N^{os} 5.635.387 y 5.643.741, y Campana, y col., Blood 85:1416-1434(1995). La médula ósea recolectada se puede depurar de células tumorigénicas o neoplásicas antes de la transfección de las HSC. Las técnicas de depuración adecuadas incluyen por ejemplo, leucoféresis de células de sangre periférica movilizadas, selección basada en inmunoafinidad o destrucción de las células tumorales, o el uso de agentes citotóxicos o fotosensibilizantes para destruir las células tumorales selectivamente, como se conoce en la técnica. Véase por ejemplo, Bone Marrow Processing and Purging, Part 5 (A. Gee, ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., 1991; Lydaki, y col., J. Photochem. and Photobiol. 32:27-32 (1996); y Gazitt, y col., Blood 86:381-389 (1995).

Las células aisladas (por ejemplo, células HSC, células de un cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, células CLL, células de cáncer de próstata, otras células cancerosas)) se pueden transfectar por cualquier técnica adecuada, como se trata en el presente documento. Tras la transfección, se puede examinar una porción de las células para confirmar la presencia de niveles de expresión apropiados de los productos génicos. Una vez que se ha confirmado la expresión adecuada de un producto génico miR, el resto de las células transfectadas se pueden entonces reintroducir en el sujeto. Las células transfectadas se pueden reintroducir en el sujeto por métodos parenterales, incluyendo la infusión intravenosa o la inyección directa en la médula ósea. Las células transfectadas se reintroducen preferentemente en el sujeto en una solución salina u otro vehículo farmacéuticamente aceptable. Un número adecuado de células para la reintroducción es de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 células por kilogramo de peso corporal del sujeto. El número de células transfectadas disponible para la reintroducción se puede aumentar expandiendo las células en un cultivo antes de la transfección.

El genoma de la célula (por ejemplo, células HSC, células de un cáncer asociado a BCL2 (por ejemplo, células CLL, células de cáncer de próstata, células de otros cánceres)) se puede transfectar con ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un producto génico miR, por ejemplo, un vector plásmido de expresión, que se integra establemente en el genoma de la célula para proporcionar la expresión del miR a largo plazo. La integración estable y la expresión se puede confirmar por técnicas conocidas en la técnica, tales como análisis de transferencia de Southern del ADN genómico utilizando un ADNc génico del miR (o fragmentos de los mismos) como sonda. La expresión de un producto génico miR puede detectarse también por técnicas de transferencia de Southern de referencia. Las células que están transfectadas establemente con una secuencia que codifica el producto génico miR continúa expresado el producto génico miR una vez que se reimplantan en el sujeto. Un método ejemplar de

aislamiento de HSC de un sujeto, transfección con plásmidos que expresan uno o más productos génicos de miR, y reimplantación de las HSC en el sujeto se describe en los Ejemplos posteriormente.

Un producto génico miR también se puede administrar a un sujeto por cualquier vía adecuada enteral o parenteral. Las vías de administración enteral para los presentes métodos incluyen el suministro oral, rectal o intranasal. Las vías adecuadas de administración parenteral incluyen la administración intravascular (por ejemplo, la inyección intravenosa en embolada, la infusión intravenosa, la inyección intraarterial en embolada, la infusión intraarterial y la instalación de un catéter en el sistema vascular); la inyección peri- e intratisular (por ejemplo, inyección peri-tumoral e intra-tumoral, inyección intra-retinal, o inyección sub-retinal); inyección subcutánea o de depósito incluyendo la infusión subcutánea (tal como por bombas osmóticas); aplicación directa en el tejido de interés, por un catéter u otro dispositivo implantado (por ejemplo, un microgránulo retinal o un supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso); y por inhalación. Un producto génico miR se puede administrar por inyección o infusión. Para el tratamiento de cánceres asociados a BCL2 que implican tumores sólidos, un producto génico miR se puede administrar por inyección directa dentro del tumor.

Se puede administrar un producto génico miR al sujeto sea como ARN desnudo o con un reactivo de suministro, o como un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido recombinante o un vector vírico) que comprende una secuencia que expresa el producto génico. Los reactivos de suministro adecuados para la administración del producto génico incluyen, por ejemplo el reactivo lipofílico Mirus Transit TKO; lipofectina; lipofectamina; cellfectina; policationes (por ejemplo, polilisina); y liposomas.

Los plásmidos recombinantes que comprenden secuencias que expresan un producto génico miR se tratan en el presente documento, y métodos para el suministro de tales vectores a las células (por ejemplo, células HSC, células de un cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, células de CLL, células de cáncer de próstata, otras células cancerosas)) de un sujeto se encuentran en la experiencia de la técnica.

Se pueden utilizar liposomas para suministrar un producto génico miR, o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un producto génico miR, a un sujeto. Los liposomas también pueden aumentar la semivida de un producto génico miR o ácido nucleico. En la práctica de este método, un producto génico miR, o un ácido nucleico que codifica un producto génico miR, se encapsula en los liposomas antes de la administración al sujeto.

Los liposomas adecuados para su uso en este método se pueden formar a partir de lípidos formadores de vesículas de referencia, que incluyen en general fosfolípidos neutros o cargados negativamente, y un esteroles, tal como el colesterol. La selección de lípidos está se rige en general por la consideración de factores, tales como el tamaño deseado del liposoma y la semivida de los liposomas en la corriente sanguínea. Se conocen varios métodos para preparar liposomas, por ejemplo, los descritos en Szoka, y col., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980); y Patentes de EE. UU. N^{os} 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, y 5.019.369.

Los liposomas que encapsulan un producto génico miR, o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un producto génico miR, puede comprender una molécula ligando que dirige el liposoma a una célula de un cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, una célula de CLL, una célula HSC, una célula de cáncer de próstata, otra célula cancerosa). Se puede utilizar un ligando que se une a un receptor que es prevalente en tales células (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a un antígeno celular del tumor o un marcador de superficie celular de un cáncer).

Los liposomas que encapsulan un producto génico miR, o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un producto génico miR, también se pueden modificar de forma que evite el aclaramiento por el sistema mononuclear fagocitario ("MMS") y el sistema reticuloendotelial ("RES"). Tales liposomas modificados pueden tener restos de inhibición de la opsonización en la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. Un liposoma puede comprender ambos, restos de inhibición de la opsonización y un ligando.

Los restos de inhibición de la opsonización para su uso en la preparación de liposomas son normalmente grandes polímeros hidrofílicos que se unen a la membrana del liposoma. Como se utilizan en el presente documento un resto de inhibición de la opsonización se "une" a una membrana de liposoma cuando está fijado física o químicamente a la membrana, por ejemplo, por intercalación con un ancla liposoluble en la membrana en sí misma, o uniéndose directamente a grupos activos de los lípidos de membrana. Estos polímeros de inhibición de la opsonización forman una capa protectora de superficie que disminuye significativamente la captación de los liposomas por el MMS y RES; por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. N^o 4.920.016.

Los restos de inhibición de la opsonización adecuados para modificar liposomas son preferentemente polímeros solubles en agua con un número medio de peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 daltons, y más preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 daltons. Tales polímeros incluyen derivados de polietileno glicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG); por ejemplo, metoxi PEG o PPG, y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poli(acrilamida) o poli N-vinil pirrolidona; poliamidaminas lineales, ramificadas, o dendríméricas; ácidos poliacrílicos; polialcoholes, por ejemplo, polivinilalcohol y polixilitol a los que se unen químicamente grupos amino o carboxilo, así como gangliósidos, tales como gangliósidos GM₁. También son

5 adecuados copolímeros de PEG, metoxi PEG, o metoxi PPG, o derivados de los mismos. Además, el polímero de inhibición de la opsonización puede ser un copolímero PEG de bloqueo y o bien un poliaminoácido, polisacárido, poliamidoamina, polietilenamina, o polinucleótido. Los polímeros de inhibición de la opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péctico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenano; polisacáridos aminados u oligosacáridos (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo, que reaccionan con derivados de ácidos carbónicos con la unión resultante de grupos carboxílicos. El resto de inhibición de la opsonización puede ser un PEG, PPG, o un derivado de los mismos. Los liposomas modificados con PEG o con derivados de PEG se denominan a veces "liposomas PEGilados".

10 El resto de inhibición de la opsonización se puede unir a la membrana del liposoma por cualquiera de las técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG se puede unir a un ancla liposoluble fosfatidil-etanolamina, y luego se une a una membrana. De manera similar, un polímero de dextrano se puede derivar con un ancla liposoluble estearilamina por medio de la aminación reductora utilizando Na (CN) BH3 y una mezcla disolvente, tal como tetrahidrofurano y agua en una proporción 30:12, a 60 °C.

15 Los liposomas modificados con restos de inhibición de la opsonización permanecen en la circulación mucho más tiempo que los liposomas sin modificar. Por esta razón, tales liposomas a veces se llaman liposomas "furtivos". Se sabe que los liposomas furtivos se acumulan en tejidos irrigados por un sistema microvascular poroso o "que rezuma". Por lo tanto los tejidos que se caracterizan por tales defectos del sistema microvascular, por ejemplo, los tumores sólidos, acumularán estos liposomas eficazmente; véase Gabizon, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 18: 6949-53 (1988). Además, la captación por el RES reducida disminuye la toxicidad de los liposomas furtivos evitando la acumulación significativa de liposomas en el hígado y el bazo. Por lo tanto, los liposomas que se modifican con restos de inhibición de la opsonización son particularmente adecuados para el suministro de productos génicos miR, o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican los productos génicos a las células tumorales.

20 Se describe en el presente documento un método de prevención o tratamiento de un cáncer asociado con sobre-expresión de un gen BCL2 o un producto génico (por ejemplo, ARN, proteína) en un sujeto que tiene necesidad de tal tratamiento, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un producto génico miR. La proteína Bcl2 y los miembros de la familia Bcl2, así como su papel en el cáncer, se describen en Cory, S., y Adams, J.M., Nature Reviews 2: 647-656 (2002) y Sanchez-Beato, M., y col., Blood 101: 1220-1235 (2003). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos del ADNc y la proteína BCL2, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de ADNc y proteína BCL2

Nombre	Secuencia	SEC ID N°
ADNc BCL2 (N° Reg. Genbank NM_0006 33)	TTTCTGTGAAGCAGAGAGTCTGGAAATCGATCTGAAATCCTCCTAAATTTTACTCCCTCTCCCGCGGACTCCTGATTC ATTGGAAATTTCAAATCAGCTATAAATCGGAGAGTGTGAAGATTGATGGGATCGTTGCCCTTATGCAATTTGTTTGGT TTTACAAAAGGAAACTTGACAGAGGATCATGCTGTACTTAAAAAATACAACATCACAGAGGAAATGACTGATATTA ACAATACTTACTATAATAAAGTGCCTCATGAAATAAAGATCCGAAAAGGAAATGGAATAAAAAATTTCCCTGCATCTCAT GCCAAGGGGAAACACAGAAATCAAGTGTCCCGGTGATTTGAAGACACACCCCTCTGTCCAAGAAATGCAAAAGCACATCCA ATAAAAATAGCTGGATTATAACTCCCTCTTCTTCTGGGGCCGTGGGTGGGAGCTGGGCGAGAGGTGCCGTTGGC CCCCCTTGTCTTCCCTGGGAAAGGATGGCGACGCTGGGAAACAGGGTACGATAACCCGGGAGATAGTGAATGAAATA CATCCATTAAGCTGTGCGAAGAGGGCTACGATGGATGGGATGGGGAGATGTGGCGCCCGCCCGGGGGCCGCC CGACCCGGGATCTTCTCCAGCCCGGGCACGCCCAATCCAGCCGATCCCGGACCCGGTCCGCGAGACCTC GCCGTGCAGACCCCGGCTGCCCGCCCGGGGCTGCGCTCAGCCCGGTGCCACCTGTGGTCCACCTGAC CCTCCGCCAGGCGGGGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGCGGGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGAC GCCCTTCAACCGCGGGGACGCTTGGCACGGTGTGGAGAGCTTTCAGGGACGGGTGAACCTGGGGAGGATGT GGCCTTCTTTGAGTTCGGTGGGTCTATGTGTGGAGGCTCAACCCGGGAGATGTGCCCTGGTGGACAACTCGC CCTGTGGATGACTGATACCTGAACCCGGCACTGCACCTGGATCCAGGATTAACGGAGGTGGATGCCCTTGTGGA ACTGTACGGCCCCAGCATGGCCCTCTGTTGATTTCTCTGGCTGTCTCTGAAGACTCTGCTAGTTGGCCCTGGT GGGAGCTTGCATCACCTGGTGCCTATCTGGCCACAAGTGAAGTCAACATGCCCTGCCCAACAATAATGCAAAAG GTTCACTAAGCAGTAGAAATAATATGCAATGTCTAGTGTACCATGAAACAAAGCTGCAGGCTGTTAAGAAAAA TAACACATATAAACATCACACACACAGACACACACAAATTAACAGTCTTCAGGCAAAACGTCGA ATCAGCTATTTACTGCCAAAAGGAAATATCATTTATTTTACATATTAAGAAAAAAGATTTATTTAATTAAGACA GTCCCAITCAAACCTCCTGTCTTGGAAATCCGACCACTAAATGCCAAGCACCCGCTTCGTGTGGCTCCACCTGGATGTT CTGTGCCCTGTAACAATAGATTGGCTTTCCATGTTGTGGCCGGAATCACCATCTGAAGAGCAGACGGATGGAAAAAGGA CCTGATCATTTGGGAGCTGGCTTCTGGCTGGAGGCTGGGGAGAGGTTCATTCACCTTGGCATTTCTTTGCC TGGGGCTGTGATATTAACAGAGGGAGGTTCCTGTGGGGGAAATCCCATGCCCTGCCCTGAAGAAAGAGACTCTT TGCATATGACTCACATGATGCATACCTGGTGGGAGGAAAGAGTTGGAACTTCAGATGGACCTAGTACCCACTGAGA TTTCCACGCCGAGGACAGCGATGGGAAAAATGCCCTTAAATCATAGGAAAGTATTTTTTAAGCTACCAATTTGCC GAGAAAGCATTTTAGCAATTTATACAATAATCATCCAGTACTTAAGCCCTGATTTGTGATATTAATATTTTGGAT ACGCACCCCACTCCCAATACTGGCTCTGTCTGATGTAAGAAACAGAAATCCTCTGGAACCTTGAGGAAAGTGAACATTT CGGTGACTTCCCGCATCAGGAAAGCTAGATTACCCAGAGCATCAGCCCGCCACAAGTGCCTGCTTTTAGGAGACCCGAA	55

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
	<p>GTCCGAGAACTGCCTGTGTCCAGCTTGGAGGCTGGTCTGTGAACTGGAGCCGCTCCCTCAGTGGCCCTCCTCCAG GGATGATCAACAGGGGAGTGGTCTCCGAAATGCTGGAAAGCTGATGGAGCTCAGAAATCCACTGTCAAGAAAGAGCA GTAGAGGGTGTGGTGGCCCTGCACCCCTGGGCCCTCCAGTAGGCCGCTTCCAGTAGGAGCATGGGAGCCCGA CCCTCTTAAAGACATGATCACTGTAGAGGAAGAAAGAGCCCTGGCCCTTCCATACAGAAAGCATGGTGAAG GCTGGGAACTGTAGGAGGAGGAAATGGCCACGGCCCAATTTGGCTGTAGCACATGGCACAGTTGGCTGTGGCCCTTGGC CCACTGTGAGTTTAAAGCAAGGCTTAAATGACTTGGAGAGGTCACAAATCCFAAAAGAGCATTTGAAGTGGGT GTCAATGATTAATGACCCCTGTATGGAATACATTAACATTTCTGTCTAGTCTAGTCTGGTTTATTTAA AACTGACAAAAAAGTCCAGGTGGAAATAGGGGTTATCTGTACATCCIGGGCAITAAAAAATAAATCAAT GGTGGGAACTATAAAGAAGTAAACAAAGAGTACATCTTCAACAAATAAATAGGAAATTTTCTTCCAGTT TAGAATCAGCCTTGAACATTTGAAATAACTCTGTGGCAITATGCAITATATACCAITTTATCTGATTAACCTTTG GAATGACTCTGTTCAAATGTTAAATGCTGGTGTGATTTCCGAAAGCTGCTTTAAAAAATAACATGCACTCAGCGT TTTTTTGTTTTAAATGATTTAGTTATGGCTATACACTATTTGTAGCAAAAGTGTCTTTTCTGTTTGGATTT TTATCTTTGATTTTCAAAAGCAATCTGAGAAAGTGTAGAACCCCTGAGTCTCAGTACCTAAGAAAAAACCTGGAT GTCACTGGCCACTGAGGAGCTTTGTTCAACCAAGTCACTGTGCAITTCACGTCACAGAAATGTTTTATGTGACAGT TAAATCTGTGTCCTTGGCTTGTGAAAGTTTCTGTAAGTTTCCCTGTCCTGGCAATCCGCAITTAATTCATGGTATT CAGGATACATGCTGTTGGTTAAACCCATGAGATTCATTCAGTTAAAAATCCAGATGGCAATGACCAGCAGATTC AAATCTAAGTGGTTGACCTTTAGAGAGTTGCTTTACGTGGCTGTTTCAACACACAGACCCACAGAGCCCTCCCTGC CCTCCTCCGGGGGCTTTCTCATGGCTCTTCCAGGGTCTTCCGAAATGCAAGTGGTTCAGCTCCACCAAGA AAGCAGAAACTGTGGTATGAAGCCAGACTCCCGGGGGCTCAGGAAACAGAAATGATCAGACCTTTGAAATGATTT CTAATTTTAAAGCAAAATATTTTATGAAGGTTTACATCTCAAAGTATGAAATATGAAATATCCAATCCTGTGC TGCTATCCTGCCAAAATCATTTTAAATGAGTCAAGTTGCAAGTATGCTCCAGTGGTAAAGTCCCAAGTCTTTAG AAGTAAACAATGAAGAGCTGGAGCTTTTAAATATAAGCCCTGTTTGTCTTTTGTCTTCAAAGGSAATCACAG AGTATTTGAAAAATGATATATATTAAGAGTCAAGGGGCTAAATGCTGGCTGGCTGCTTTGCTGGGGTTTTG TTACCTGGTTTTAATAACAGTAAATGTGCCAGCCTTTGGCCAGACTGTACAGTATTTGGCTGGCACTTGGCTCT AAGAGTAGTTGATGTCATTTTCTTATTTAAAAACATGTTAGAAGCAATGAATGATATAAAAAAGCCTCAACTAG TCATTTTTTCTCCTCTTTTTTTTTTCAATTAATCTAATTAATTTGCAAGTTGGCAACAGAAACCCATCCCTATTTT GTATTAAGAGGATTCACATCTGATCTTAACTGCTTTTATGAATGAAAAACAGTCCCTCTGTATGTAATCCTCTT TACACTGGCCAGGGTCAGAGTTAAATAGATATAIGCACTTTCCAAATTTGGGACAGGGCTTAAAAAAGCCCAA AAGGAGAAACATCTGAGAACCTCCTCGGCCCTCCAGTCCCTCGCTGCAAAATACCTCGCAAGAGAGCCAGAA GACAGCTGACAGGTTCTATGGCCATCGGGTCTCGAAGATTTGGCAGGGGCAAAACTTGGCAGGCTTAAAGAT TTGGAATAAAGTACAGAAATTAAGGAAGCACTCAATTTAGTTCAACAAAGACCAACTTCTTCCACAGCTCACT TACCTCTCTGTGTTTCAAGTGGCCCTTCCATTTATATGTTGATCTTTGTTTTTATTTAGTAAATGCTTATCACTAAAGAT</p>	

Nombre	Secuencia	SEC ID N°
	<p>GTAGCTCTGGCCAGTCGGGAAAATAGGAAGTATATAAATCGAGAGGAGTTATAAATCAAGATTAAATGTAAA TAAATCAGGGCAATCCCAACACATGTCTAGTCTTCACTCCAGGACTATATGAGTGAAACAGAAATGCAAAATAGTCTCTA TTTGTAATGAACTTATCCTAAAACAAATAGTTTATAAATGAACTTAAACTCTAAATTAATCCAACTGTACTTTTA AGCAGTGGTGTGTTTTAGACTTTCTTATCACTTATAGTATAGTAATGACCTACTCTATCAGAGAAAACAGGAAA GGTCGAAATACAAGCCATCTAAGGAAATAGGGAGTCAGTTGAAAATCTATCTGATCTTATCTGTGGTGTCTTT TGCAGCCAGACAAATGTGGTTACACACTTTTAAAGAAATACAATTTCAATGTCAAGCTTATGAAGTTCCAATCA GATCTTTATTTGTTAATCAATTTGGATCTTTCAGGGATTTTTTTTTTAAATATATGGGACAAAGGACATTTGTTGGA GGGTGGAGGGAGGAAGAAATTTAAATGTAAAACATTTCCAAAGTTTGGATCAGGAGTTGGAAGTTTCAAGATAA CCAGAACTAAGGGTATGAAGGACCTGTATTTGGGTGATGATGCTCTGGAAGAACCTTGTGTGACAAATGAGAA ACAATTTGAAGTTTGGTACGACCTTTAGATCCAGAGACATCAGCATGGCTCAAAGTGCAGCTCCGTTTGGCAGTG CAATGGTATAAATTTCAAGCTGGATATGTCTAATGGGTATTTAAACAATAAATGTCAGTTTAACTAACAGGATATT TAAATGACAACTTCTGGTGGTAGGGACATCTGTTTCTAAATGTTTATATGTACAATACAGAAAAAATTTTATAAA ATTAAGCAATGTGAACTGAATGGAGAGTATAACAAGTCCCTTAGTCTTACCCAGTGAATCAATCTGTCCCATG TCTTTGGACAACCATGACCTTGGACAATCATGAAATATGCATCTCACTGGATGCAAGAAAATCAGATGGAGCATGAA TGGTACTGTACCGGTTCACTGGACTGCCCGAGAAAATAACTTCAAGCAACATCCATCAACAACAAGGTTGTCT GCATACCAAGCTGAGCACAGAAGATGGAACTGGTGGAGGATGGAAGGCTCGCTCAATCAAGAAAATCTGAGAC TATTAATAAATAAGACTGTAGTGTAGATCTGAGTAAATCCATGCACCTAAACCCTTTGAAAATCTGCCGTGGGCC TCCAGATAGCTCATTTCAATTAAGTTTTCCCTCCAAGGTAGAAATTTGCAAGAGTGACAGTGGATTGCAATTTCTTTGG GGAAGCTTCTTTTGGTGGTTTTGTTTTATATACCTTCTTAAGTTTTCAACCAAGGTTTGCITTTGTTTGGATTACT GGGTTATTTTTGTTTTAAATAAATAAAGTGTACAATAAGTGTTTTTTGTATTGAAAGCTTTTGTATCAAGATTTTC ATACTTTTACCTCCATGGCTTTTTTAAGATTGACTTTTAAAGAGTGGTGTATTTCTGCAACACTGTACACATA AAAAAACGGTAAGGATACCTTACATGGTTAAGGTAAGTAAAGTCTCCAGTGGCCACCATAGCTATATAATGGCACTT TGTTTGTGTTGTTGGAAAAAAGTCACATTTGCCATTAACCTTTCCCTTGTCTGTCTAGTTAAATTTGTGAAGAAAAATAAA GTACAGTGTGAGATACTG</p>	
<p>Proteina Bcl2 (N° Reg. Genbank NIM_0006 24)</p>	<p>MAHAGRTGYDNRREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAGDVGAAAPPGAAPAFGIFSSQPGHTPHPAASRDPVARTSPLQTPAAP GAAAAPALSFPVFPVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEISSQLHLTPFTARGRFATWBELEFRDGNWGRIVAFVFFEGGV MCVESVNREMSPLVDNIALWMTTEYLNRHLHTWIQDNGGWDFAVELYGFSPMRPLFDFSWLSLKTLLSLALVGCITLGA YLGHK</p>	56

Los métodos para detectar el nivel de un producto génico BCL2 se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede detectar el nivel de expresión de una transcripción génica BCL2 en una muestra de células utilizando técnicas que ya se han descrito en el presente documento (por ejemplo, transferencia de Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR). La detección del nivel de expresión de la proteína Bcl2 se puede conseguir utilizando las técnicas que se aplican comúnmente, por ejemplo, la inmunotinción o la transferencia de Western, que se describen en Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel y col., eds., Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., 1998, Capítulo 10.

Los cánceres que sobre-expresan Bcl2 se conocen por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a estos, leucemias, linfomas y carcinomas (véase Kim, R., y col., Cancel 101(11): 2491-2502 (2004); Patente de EE. UU. N° 5.789.389; y Patente de EE. UU. N° 6.800.639). Los cánceres particulares conocidos de los que se sabe que se asocian con sobre-expresión de Bcl2 incluyen CLL, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, melanoma, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma no Hodgkin, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, enfermedades hematológicas malignas, tumores sólidos, cáncer colorrectal, carcinoma cerebral, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, enfermedad linfoproliferativa asociada con el virus de Epstein-Barr, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular y carcinoma gástrico, entre otros.

El al menos un producto génico miR que se administra al sujeto que tiene necesidad del tratamiento puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia de nucleótidos complementaria" significa una secuencia de polinucleótidos que es capaz de formar pares de base por medio de enlaces de hidrógeno con otra secuencia de nucleótidos de la que es complementaria. Tales enlaces de hidrógeno se forman entre una purina y una pirimidina (por ejemplo, entre adenina y timina o uracilo, entre guanina y citosina) por medio del emparejamiento de bases de referencia de Watson y Crick. Como se utiliza en el presente documento "par de base Watson-Crick" se refiere a un par de bases unidas por un enlace de hidrógeno en cadenas opuestas antiparalelas de un ácido nucleico. Las reglas de emparejamiento de bases, que se elaboraron por primera vez por Watson y Crick, son bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, estas reglas necesitan que la adenina (A) se empareje con timina (T) o uracilo (U), y la guanina (G) se empareje con citosina (C), en cadenas complementarias antiparalelas una a la otra. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "emparejamiento de bases de Watson-Crick" engloba no solo los pares de bases de referencia AT, AU o GC, sino también los pares de bases que se forman entre las bases que no son de referencia o que están modificadas de análogos de nucleótidos capaces de unirse por medio de enlaces hidrógeno a una base de referencia o a otra base complementaria que no es de referencia. Un ejemplo de tales emparejamientos que no son de referencia es el emparejamiento que implica el análogo de nucleótido inosina, en el que su base hipoxantina puede formar dos enlaces de hidrógeno con la adenina, citosina o uracilo.

El al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria en el 100 % (es decir, exactamente complementaria) a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. El al menos un producto génico miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que sea al menos complementaria en al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 99 % con una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. La región de complementariedad puede tener aproximadamente 5 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, o más particularmente, de aproximadamente 7 a aproximadamente 12 nucleótidos de longitud. Ejemplos de productos génicos que tienen complementariedad con una secuencia de nucleótidos de una construcción génica BCL2 incluyen, pero sin limitarse a estos, miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, y miR-186 (véase, por ejemplo, la Tabla 5). El producto génico miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID N° 55. Ejemplos de tales productos génicos miR incluyen, pero no se limitan a estos, miR-15a, miR-16-1, miR-15b y miR-16-2. El producto génico miR puede no ser miR-15a o miR-16-1. Los métodos para administrar un producto génico miR, varias de las cuales se han descrito en el presente documento, son bien conocidos en la técnica.

También se desvela un método para aumentar la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto que tiene un cáncer, que comprende la administración al sujeto de al menos un producto génico miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2, y adicionalmente administrar al menos un tratamiento contra el cáncer al sujeto. El tratamiento contra el cáncer puede ser cualquier tratamiento contra el cáncer que conocen los expertos en la técnica. Tratamientos contra el cáncer adecuados incluyen, pero sin limitarse a estos, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de las mismas (por ejemplo, quimiorradiación). También se desvelan métodos para aumentar la eficacia de terapias no convencionales del cáncer.

Como se utiliza en el presente documento, quimioterapia se refiere a la administración de una o más sustancias químicas o fármacos para el tratamiento del cáncer. Un agente quimioterápico adecuado puede ser cualquier sustancia química que se sabe que es útil para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN,

agentes antibióticos antitumorales, agentes anti-metabólicos, agentes estabilizantes de tubulina, agentes desestabilizantes de tubulina, agentes antagonistas de hormonas, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la proteína quinasa, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de la ciclina, inhibidores de la metaloproteína, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos, y agentes víricos modificados molecularmente, bacterianos o exotóxicos. Ejemplos de agentes particularmente adecuados para su uso en los métodos desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a estos, arabinósido de citidina, metotrexato, vincristina, etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina) cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabin, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomomicina-D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecan, topotecán, leucovorín, carmustina, estreptozocina, CPT-11, taxol y derivados del mismo, tamoxifeno, dacarbazina, rituximab, daunorubicina, 1-β-D.-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel y FOLFOX4.

Como se utiliza en el presente documento, la radioterapia se refiere al uso de radiación de alta energía para el tratamiento del cáncer. La radiación de alta energía para su uso en la radioterapia puede proporcionarse por rayos X, rayos gamma y neutrones, entre otros. Son bien conocidos diferentes métodos de radioterapia en la técnica y son adecuados para los métodos desvelados en el presente documento. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a estos, radiación de rayo externo, braquiterapia, radioterapia de intensidad modulada (IMRT), radiación por implante, radiación sistémica y radioterapia estereotáctica.

Los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente” se definen en el presente documento para incluir animales, tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitarse a estos, primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedores o murinas. En una realización preferida, el animal es un ser humano. En una realización el sujeto es un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece uno o más cánceres asociados con BCL2. Como se describe en el presente documento, los cánceres asociados con BCL2 que son adecuados para el tratamiento con los métodos de la invención incluyen, linfomas, carcinomas y leucemias, entre otros. En una realización particular, el cáncer asociado con BCL2 es un cáncer que se caracteriza por el aumento de expresión (por ejemplo, sobre-expresión, regulación positiva) de un gen BCL2 o un producto génico (por ejemplo, ARN, proteína). Ejemplos de cánceres asociados con BCL2 particularmente adecuados incluyen, CLL, leucemia mieloide, mieloma múltiple, melanoma, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma de no Hodgkin, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, enfermedades hematológicas malignas, tumores sólidos, cáncer colorrectal, carcinoma cerebral, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, enfermedad linfoproliferativa asociada al virus de Epstein-Barr, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular y carcinoma gástrico, entre otros. En otra realización, el cáncer es una CLL. En otra realización el cáncer es un linfoma. En otra realización más, el cáncer es un cáncer de pulmón. En otra realización más, el cáncer es un cáncer de próstata.

La eficacia de un tratamiento contra el cáncer se puede aumentar administrando al menos un producto génico miR a un sujeto. El producto génico miR se puede co-administrar (es decir, simultáneamente) con un agente quimioterápico, o se puede administrar separadamente. El producto génico miR puede ser complementario a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. Ejemplos de tales productos génicos miR incluyen pero no se limitan a estos, miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, y miR-186 (véase la Tabla 5). El producto génico miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID Nº 55, por ejemplo, miR-15a, miR-16-1, miR-15b y miR-16-2. El producto génico miR puede no ser miR-15a o miR-16-1.

Un aumento de la eficacia de un tratamiento contra el cáncer se puede evidenciar por el aumento de la remisión del cáncer en un sujeto con respecto a un control adecuado. La remisión del cáncer se puede determinar de acuerdo con referencias clínicas aceptadas, tales como una disminución del número de células cancerosas en el sujeto y/o la disminución de la masa tumoral y/o el tamaño. El número de células de un cáncer asociado con BCL2 en un sujeto se pueden determinar por medición directa, o por estimación a partir del tamaño de las masas tumorales primaria o metastática.

La sensibilidad de una célula cancerosa a los efectos citotóxicos de un agente anti-cáncer se puede aumentar proporcionando al menos un producto génico miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2 a la célula. Proporcionando el al menos un producto génico miR a la célula, la sensibilidad de la célula al agente anti-cáncer se aumenta.

Un método para aumentar la sensibilidad de una célula cancerosa a los efectos citotóxicos de un agente anti-cáncer puede comprender proporcionar al menos un agente anti-cáncer a una célula cancerosa y adicionalmente proporcionar al menos un producto génico miR a la célula cancerosa, en donde el al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. El agente anti-cáncer puede ser cualquier agente que se sabe que es útil para tratar el cáncer. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a agentes quimioterápicos y radiación. Ejemplos de agentes quimioterápicos adecuados se han descrito en el presente documento anteriormente.

Como se utiliza en el presente documento, la frase “efectos citotóxicos de un agente anti-cáncer” se refiere a cualquier daño celular y/o muerte que se produce como resultado de la administración del agente. Un aumento de la sensibilidad de una célula cancerosa a los efectos citotóxicos de un agente anti-cáncer se puede evidenciar por un aumento en la gravedad del daño células y/o un aumento en la cantidad o tasa de células muertas que se produce como resultado de la administración del al menos un agente anti-cáncer y al menos un producto génico miR, con respecto a una célula control en la que solo se proporciona un agente anti-cáncer. Las técnicas para evaluar la citotoxicidad (por ejemplo, el daño celular y/o la muerte) se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a estos, los ensayos para controlar la proliferación celular, el crecimiento celular y la muerte celular (por ejemplo, apoptosis, necrosis).

Las células adecuadas incluyen células cancerosas. La célula cancerosa puede sobre-exresar un producto génico BCL2 (por ejemplo, ARN, proteína). La célula cancerosa puede ser una célula *in vivo* (por ejemplo, una célula de un cáncer asociado con BCL2 en un mamífero (por ejemplo, un ser humano)). La célula cancerosa se puede obtener de una muestra de un paciente (por ejemplo, biopsia, sangre) o se puede obtener de una línea celular cancerosa establecida o una línea celular derivada de una célula cancerosa de una muestra del paciente. La célula cancerosa puede ser de una muestra del paciente que se obtuvo de un sujeto que tiene un cáncer asociado con sobre-expresión de Bcl2. Ejemplos de tales cánceres incluyen, entre otros, CLL, leucemia mieloide, mieloma múltiple, melanoma, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma de no Hodgkin, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, enfermedades hematológicas malignas, tumores sólidos, cáncer colorrectal, carcinoma cerebral, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, enfermedad linfoproliferativa asociada al virus de Epstein-Barr, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular y carcinoma gástrico, entre otros. En una realización, el cáncer es una CLL. En otra realización el cáncer es un linfoma. En otra realización más, el cáncer es un cáncer de pulmón.

La sensibilidad de una célula cancerosa a los efectos citotóxicos de un agente quimioterápico se puede aumentar proporcionando a la célula cancerosa al menos un producto génico miR. El producto génico miR puede ser complementario a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. Ejemplos de tales productos génicos miR incluyen pero no se limitan a estos, miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, y miR-186 (véase la Tabla 5). El producto génico miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID N° 55, por ejemplo, miR-15a, miR-16-1, miR-15b y miR-16-2. El producto génico miR puede no ser miR-15a o miR-16-1.

Los productos génicos miR utilizados en los métodos desvelados en el presente documento preferentemente se formulan como composiciones farmacéuticas antes de administrarlos al sujeto, según las técnicas conocidas en la técnica. En consecuencia, la presente invención engloba composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un producto génico miR. El producto génico miR es miR15 o miR16 (por ejemplo, miR-15a o miR-16-1) y comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. Los productos génicos miR alternativos incluyen, pero no se limitan a estos, miR-182, miR-181, miR-30, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, and miR-186 (véase la Tabla 5).

Las composiciones de la invención además comprenden al menos un agente anti-cáncer. Muchos agentes quimioterápicos que son útiles para el tratamiento del cáncer se conocen bien en la técnica. Los agentes quimioterápicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención se han descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, la cantidad del agente quimioterápico que se administra por dosis es desde aproximadamente 0,0001 a 1000 mg/kg, aproximadamente 0,5 a 70 mg/kg o aproximadamente 1 a 50 mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se caracterizan por que son estériles y libres de pirógenos. Como se utiliza en el presente documento, “composiciones farmacéuticas” incluye las composiciones para uso veterinario y en seres humanos. Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención están en la experiencia de la técnica, por ejemplo, como se describe en Remington’s Pharmaceutical Science, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985).

En una realización, las presentes composiciones farmacéuticas comprenden el producto génico miR, o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico (por ejemplo, 0,1 a 90 % por peso), o una sal fisiológicamente adecuada del mismo, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender el producto génico miR, o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico, que está encapsulado en liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos son agua, agua tamponada, solución salina normal, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, ácido hialurónico y similares.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un producto génico miR que es resistente a la degradación por nucleasas. Un experto en la técnica puede fácilmente sintetizar un producto génico miR que sea resistente a nucleasas, por ejemplo, incorporando uno o más ribonucleótidos que estén

modificados en la posición 2' en el producto génico miR. Los ribonucleótidos modificados en 2' adecuados incluyen los que se han modificado en la posición 2' con fluoro, amino, alquil, alcoxi, y O-alil.

5 Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un producto génico miR que incorpora uno o más ribonucleótidos modificados en 2' de la fórmula 2'AR-nucleótido, en donde:

A es oxígeno o un halógeno (preferentemente, flúor, cloro, o bromo); y
R es hidrógeno o una cadena C₁₋₆ alquil recta o ramificada:

10 siempre y cuando A sea un halógeno, R se omite. Un ribonucleótido modificado en 2' preferido es 2'-O metil ribonucleótido. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un producto génico miR en el que cada ribonucleótido es un ribonucleótido modificado en 2'.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender también excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen los estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolaridad, tampones y agentes de ajuste del pH. Los aditivos adecuados incluyen los tampones fisiológicamente compatibles (por ejemplo, hidrocloreto de trometamina), quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de calcio quelado (por ejemplo, DTPA cálcico, CaNaDTPA-bisamida), u, opcionalmente, adiciones de sales de sodio o calcio (por ejemplo, cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico). Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden envasar en forma líquida, o pueden estar liofilizadas.

25 Para las composiciones farmacéuticas sólidas de la invención, se pueden utilizar vehículos farmacéuticamente convencionales sólidos no tóxicos; por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato magnésico y similares de calidad farmacéutica.

30 Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes enumerados anteriormente y un 10-95 %, preferentemente un 25 %-75 %, del producto génico miR. Una composición farmacéutica para su administración en aerosol (por inhalación) puede comprender del 0,01-20 % por peso, preferentemente 1-10 % por peso, del producto génico miR encapsulado en un liposoma, como se ha descrito anteriormente, y un propelente. Se puede incluir también un vehículo si se desea, por ejemplo, lecitina para el suministro intranasal.

35 También se desvela en el presente documento un método para determinar la eficacia de la terapia de un cáncer en un sujeto, que comprende la administración de al menos un agente de ensayo al sujeto, midiendo posteriormente la expresión de un producto génico miR en una muestra del sujeto. El producto génico miR puede ser complementario a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2. Ejemplos de tales productos génicos miR incluyen, pero no se limitan a estos, miR-182, miR-181, miR-30, miR-15a, miR-16-1, miR-15b, miR-16-2, miR-195, miR-34, miR-153, miR-21, miR-217, miR-205, miR-204, miR-211, miR-143, miR-96, miR-103, miR-107, miR-129, miR-9, miR-137, miR-217, y miR-186 (véase la Tabla 5). El producto génico miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID N° 55, por ejemplo, miR-15a, miR-16-1, miR-15b y miR-16-2. El producto génico puede no ser miR-15a o miR-16-1.

45 Un aumento de la expresión del producto génico miR que sea complementario a una secuencia de nucleótidos de una transcripción génica BCL2, después de la administración del agente, puede ser indicativo de una respuesta favorable al tratamiento. Los métodos para detectar el nivel de expresión de un producto génico miR se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a estos, tales técnicas como las descritas anteriormente en el presente documento (por ejemplo, transferencia de Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*). Los agentes adecuados para ensayarse incluyen moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, y macromoléculas biológicas de origen natural, entre otros. Sujetos particularmente adecuados incluyen los individuos que padecen uno o más cánceres asociados con sobre-expresión de Bcl2.

La invención se ilustrará a continuación por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

55 Ejemplos

Se utilizaron las siguientes técnicas en los Ejemplos 1-4:

Muestras de pacientes y líneas celulares

60 Se obtuvieron las muestras de los pacientes después del consentimiento informado de pacientes diagnosticados de CLL en Instituciones del Consorcio de Investigaciones de CLL. En resumen, se obtuvo sangre periférica de pacientes de CLL y se aislaron las células mononucleares por centrifugación en gradiente Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y luego se procesaron para extraer el ARN y ADN según los protocolos de referencia descritos en Sambrook, J., y col. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Como controles normales para los estudios LOH, se

incluyeron en pequeños trozos de papel (1-2 mm²) los ADN correspondientes de mucosa oral de los pacientes.

Se obtuvieron treinta líneas celulares humanas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA) y se mantuvieron según las instrucciones de la ATCC. Las líneas celulares eran AS283, BL2, Bla, BJAB, CA46, Namalva, P3HRI, PAPB 682, PABm, Raji (linfoma de Burkitt), Dell, SKDHL, ST486 (linfoma de células T), JM (linfoma inmunoblástico de células B), MC116 (linfoma indiferenciado), Molt3, Supt 11 (T-ALL), U266 (mieloma múltiple), A549, H1299 (carcinoma de pulmón), TE2, TE10 (carcinoma esofágico), HeLa (carcinoma de cérvix), RC48 (carcinoma renal) y 2220, 2221, 11609, 11611, LNCAP, TSUR (carcinoma de próstata).

10 Separación de células B CD5+

Se obtuvieron las tonsilas de los pacientes del grupo de edad pediátrica (3-9 años) sometidos a tonsilectomías de rutina. Se obtuvieron las células B rodeando en roseta las células mononucleares con eritrocitos de oveja tratados con neuraminidasa. Las células B se fraccionaron más por gradientes discontinuos de Percoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) como se describe en Dono, M., y col., J. Immunol. 164:5596-5604 (2000). Las células B recolectadas de la fracción de Percoll al 50 % se incubaron con mAb anti CD5 y a continuación con Ig de cabra anti-ratón conjugada con microperlas magnéticas. Se obtuvieron las células B CD5+ por selección positiva recolectando las células retenidas en la columna MS magnética utilizando el sistema MiniMACS (Miltenyi Biotec).

20 Híbridos de células somáticas

Los híbridos de células somáticas se generaron siguiendo los métodos convencionales y se seleccionaron en medio hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT) como se describe en Negrini, M., y col., Cancer Res. 54:1818-1824 (1994). El ADN derivado de clones simples y subclones celulares se aisló con el kit DNeasy tissue (Qiagen) y se seleccionaron por PCR para detectar la presencia o ausencia de marcadores en el cromosoma 13 y el cromosoma 2 (véase la Tabla 3 a continuación para las secuencias de los cebadores). Se aislaron quince clones de la fusión de un caso de CLL (CLL-B) que portaba una translocación t (2; 13) (q32; q14), y se aisló un clon de fusión de otro caso de CLL (CLL-A) que portaba la translocación t (2; 13) (q12; q13). Doce derivados CLL-B portaban un complemento completo de ambos cromosomas 13 y 2, mientras que tres portaban el del (13q) y un complemento completo del cromosoma 2. El clon simple de CLL-A portaba un cromosoma 13 con una pequeña eliminación en el 13q14 y ninguna parte del cromosoma 2.

Transferencia de Northern

Se llevó a cabo el aislamiento del ARN total utilizando el protocolo del Tri-reactivo (Molecular Research Center, Inc). Las muestras de ARN (30 µg cada una) se procesaron en geles precolados Criterion de acrilamida de desnaturalización (urea) al 15 % (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y luego se transfirieron a una membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech). Se llevó a cabo la hibridación con ATP α-³²P a 42 °C en un 7 % de SDS, 0,2 M de Na₂PO₄ pH 7,0 durante una noche. Se lavaron las membranas a 42 °C, dos veces en 2Xsspe, 0,1 % SDS y dos veces con 0,5 SSPE, 0,1 % SDS. Las sondas usadas para detectar ARN miR15 y miR16 eran respectivamente:

CACAAACCATTATGTGCTTGCTA (SEC ID N° 5); y

GCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEC ID N° 6)

Las transferencias se separaron cociéndolas en 0,1 % de SDS acuoso/ 0,1 x SSC durante 10 minutos, y se resondaron varias veces. Como control de carga se utilizó ARNr 5S teñido con bromuro de etidio.

50 Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa

Se llevó a cabo la PCR-RT para analizar los niveles de expresión génica en células CD5+ normales y en 23 muestras B-CLL. Se utilizó un microlitro de ADNc para cada reacción de amplificación utilizando el kit PCR Advantage 2 (Clontech), con 10 pmol de cada cebador específico de gen durante 35 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 65 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 1 minuto (para una lista de los cebadores utilizados, véase la Tabla 3 posteriormente). Para asegurarse de que el ARN tenía suficiente pureza para la RT-PCR, se utilizó un ensayo PCR con cebadores específicos para ADNc G3PDH (Clontech, Palo Alto, CA). Los productos RT-PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa siguiendo los procedimientos de referencia descritos en Sambrook, J., y col. (1989), *supra*.

Transferencia de Western

Los geles SDS/PAGE de lisados celulares de 9 pacientes B-CLL se sondaron con anticuerpo Middle GST-SLUG (un regalo del Dr. Thomas Look-Harvard, MA) y anticuerpo SNX2 (N17) (Santa Cruz Biotechnology, CA). Se llevó a cabo la detección utilizando un kit de detección de transferencia de Western (Amersham Pharmacia, UK) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de la base de datos

Se llevaron a cabo las búsquedas en las bases de datos “nr” y “dbEST”, y una búsqueda para las coincidencias cortas casi exactas con la herramienta de alineamiento BLAST al que se accedió a través de la página de internet del Centro Nacional de Información Biotecnológica, mantenida por los Institutos Nacionales de la Salud y la Biblioteca Nacional de Medicina. Véase también Altschul, y col., J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990) y Altschul, y col., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997). También se llevaron a cabo las búsquedas de homología de secuencias cortas con la herramienta de alineamiento FASTA proporcionada por la página de internet Biology workBench.

Tabla 3 – Cebadores utilizados para la selección de híbridos de células somáticas

Nombre	Secuencia cebadores	SEC ID N°
D2S396L	ATA CAC CTC TAA ATA TCT GTT CCA G	7
D2S396R	AAG TAG GAC CAT TCT AAT AGC C	8
D2S112L	GAG TGG CGG TGA GAA GGT AT	9
D2S112R	AGC CAT TGC TAT CTT TGA GG	10
D2S2243L	TGG GAT ATG CTT CAG GGA C	11
D2S2243R	AGC TGA CCT TGG AAT CTG GTT	12
D13S260L	AGA TAT TGT CTC CGT TCC ATG A	13
D13S260R	CCC AGA TAT AAG1 GAC CTG GCT A	14
D13S263L	CCT GGC CTG TTA GTT TTT AFT GTT A	15
D13S263R	CCC AGT CTT GGG TAT GTT TTT A	16
D13S165L	GTT TCG CCA AGC CTG TT	17
D13S165R	GTT GAC AAT AAA ATA CGC CAC A	18
D13S273L	CTG NGG CAA AAA CAA CTC TT	19
D13S273R	ATC TGT ATG TCC TCC TTT CAA TG	20
D13S1168L	AAC CTC ATT TAA ATG TAA AGC ATC A	21
D13S1168R	GTA ATG TCA TTG CTT TTG ATT TGC	22
D13S1150L	CTC TTG AGG GAA AAA AAA AAT CA	23
D13S1150R	CCA GGC AAC CAA CCA GTC	24
D13S272L	ATA CAG ACT TCC CAG TGG CT	25
D13S272R	AGC TAT TAA AGT TCC CTG GAT AAA T	26
GCT16C05L	AAG GAA TCA GAG AAA TGG GG	27
GCT16C05R	GCT GAG TCA GAG GGA TTT GA	28
D13S25FOR	AGA GGT AAA CAA ACC AAA CCC	29
D13S25REV	GCT GAC AAT CAA GAG AAG ATG	30
D13S284L	AAA ATC AGG TGG AAA CAG AAT	31
D13S284R	AAA GGC TAA CAT CGA AGG GA	32
01ALU18	CAG AAC CAG AGA AAC AGC	33
02ALU18	ATG GCA CAA CAG CTT AAC	34
ALMA301WB5	GAA TGC AGG TGT ACC TAT CAA C	35
AFMA301WB5	ACT GAG TGA CTG CTA CCC AG	36

D13S272L1	AGC TAG CCC TAT CAG GGT	37
D13S272R1	GTA AGT GGA GGT TAC CTG	38
5279F	GAA TCA TTC GTG CTA AGT GGA T	39
5451R	TGC CAA CTG CTT GAA GAA TCT C	40
7130F	ACA CCT AAC TCC TGG GTT GTT C	41
7371R	ACT AAA TGC CAG CGT TTG CAT G	42
9530F	GGT CTT ACT CTG GTT AAA TCT	43
9757R	CAT TGG TAG CTA AGG AAA CAC	44
11521F	CCA TTC AAG CCT GGA CAA TCT T	45
11802R	GAA ACT TGA GAC AAT AAG GAG C	46
12440F	CAT GTA ACC AAG ATA AAT CCG T	47
12558R	CTG GAA AAT GTA TGT GAT GAG G	48
17261F	CTG TTG CTA TCT GTA ATA ACA C	49
17494R	CTT GGA ATT TTC CAC TGA ATC	50
18701R	TCA TCA GAA GAA ATC AAG GCA G	51
18560F	CAG TGT TAG GAA TAC GCA TTC A	52
GSP2F4	CCT TGC CAG TAC GCC CAC AAG CTG	53
GSP1R1	CCC CAC CTA TGG TTG TAG TGA GCA TCC	54

Ejemplo 1: Una región de eliminación de 30 kb en híbridos de células somáticas de pacientes con CLL

5 La mínima región de pérdida en 13q14 en pacientes con CLL no estaba clara. Anteriormente, se habían descrito varias regiones eliminadas relativamente grandes (entre 130 a 550 kb) en 13q14 en la CLL (véase la FIG. 2B). Se utilizaron análisis LOH y transferencia de Southern para identificar el límite centromérico de la pérdida en el locus Alu18 (FIG. 2D), que se localiza entre *D13S1150* y *D13S272* menor de 65 kb centromérica para el exón 5 del gen *LEU2*. Los cebadores utilizados para seleccionar los híbridos de células somáticas se han dado en la Tabla 3. Sin embargo, no se encontraron eliminaciones homocigotas pequeñas o solapadas que permitieran una mejor localización del supresor tumoral diana.

15 Para definir mejor la región de pérdida en la CLL, se generaron híbridos de células somáticas de ratón LM-TK y células de CLL que portaban translocaciones de 13q14 y/o eliminaciones. La selección con PCR de los clones híbridos resultantes permitía la segregación de las dos copias del cromosoma 13 presentes en los tumores. De esta manera, se identificó una eliminación de 31,4 kb en un caso, y el punto de corte se localizó con precisión en el otro (FIG. 2D). Estos resultados indicaban que los genes supresores de tumor en 13q14 se encuentran en una región de 29 kb entre los exones 2 y 5 del gen *LEU2*. Los cebadores que se utilizaron para seleccionar los híbridos de células somáticas se dan en la Tabla 3.

20 Como se muestra en la FIG. 2, la región eliminada en los híbridos de células somáticas concuerdan con todas las regiones de pérdida comunicadas, incluyendo una región de 10 kb comunicada por Liu, y col., Oncogene 15:2463-2473 (1997). Los exones 1 y 2 de *LEU2* también se encuentran en esta región, y en la que se ha definido en el presente documento. Sin embargo, se ha excluido *LEU2* como candidato a gen supresor tumoral probable para B-CLL (véase Bullrich, y col., Cancer Res. 61:6640-6648 (2001); Migliazza, y col., Blood 97:2098-2104 (2001); Wolf, y col., Hum. Mol. Genet. 10:1275-1285 (2001); y Mertens, y col., Blood 99:4116-4121(2002)).

Ejemplo 2: Los genes miR15 y miR16 se localizan en la región mínimamente eliminada del cromosoma 13 y se expresan altamente en células CD5+

30 Se exploraron la información de secuencias disponibles públicamente y las bases de datos para detectar nuevos genes reguladores en la región de pérdida mínima en 13q14. Se localizó exactamente un grupo de dos genes miARN clonados recientemente, miR15 y miR16, en la región eliminada (FIG. 2 A). Para evaluar el nivel de expresión de miR15 y miR 16 en tejidos normales, se llevó a cabo un análisis de transferencia de Northern de miR15 y miR16 en un panel de tejidos normales, incluyendo células B CD5+ aisladas de tonsilas de individuos normales

(FIG. 3 A). Se utilizaron células B CD5+ como controles, debido a que la B-CLL se caracterizaba por una acumulación progresiva de linfocitos B CD5+. Se encontró una expresión de ambos miR15 y miR16 ubicua con el nivel más alto en linfocitos CD5+ normales. Además, el miR16 se expresaba constantemente a niveles más altos que el miR15 en tejidos normales. Estos datos indicaban que los genes miR15 y miR16 tenían un papel importante en la homeostasis de las células B CD5+.

Ejemplo 3: Los genes miR15 y miR16 están eliminados o regulados negativamente frecuentemente en las muestras de CLL con eliminaciones en 13q14

Para investigar si los genes miR15 y miR16 estaban implicados en la patogénesis de la CLL, se analizó la expresión de miR15 y miR16 en 60 muestras de CLL y 30 líneas celulares de cánceres humanos por transferencia de Northern (FIG. 3B). El 68 % de los pacientes con CLL (41/60), así como 5 de 6 líneas celulares de cáncer de próstata, mostraban una reducción significativa en la expresión al compararse con sus contrapartidas de tejido normal. Estos hallazgos demostraban que los genes miR15 y miR16 están regulados negativamente en la mayoría de los casos de B-CLL y cáncer de próstata ensayados.

Además, 23 de 60 muestras de CLL (38 %) presentaban una banda claramente identificable de aproximadamente 70 nt que representaba el ARN precursor de miR15. No se encontró la banda de 70 nt de miR15 en ningún tejido normal analizado excepto en médula ósea (FIG. 13 A), lo que indicaba que el ARN precursor de miR15 podía estar procesado ineficazmente en la CLL.

Para determinar si la regulación negativa observada de la expresión se correlacionaba con pérdida alélica en CLL, se llevaron a cabo estudios LOH con los microsatélites marcadores *D13S272* y *D13S273* en 46 pacientes con CLL en los que estaba disponible ADN normal (FIG. 3B). Los inventores descubrieron que el 68 % de las muestras informativas mostraban LOH en al menos un marcador (24 de los 35 casos). En todos los casos excepto en cuatro (el 75 %), la expresión de los productos génicos (miR15/16) estaban reducidos. Para 12 muestras, no se obtuvieron resultados reproducibles debido a la baja calidad del material de partida. Adicionalmente, los niveles de expresión estaban reducidos en 6 de 11 casos (55 %) sin LOH aparente. En estos casos, la eliminación había sido demasiado pequeña para detectarse con los marcadores analizados.

El análisis de transferencia de Northern indicaba que ambos productos génicos miR15 y miR16 se expresaban en los casos con conocidas eliminaciones homocigotas grandes en 13q14 y con menos del 5 % de células normales, apuntando a la presencia de otros genes microARN altamente similares en el genoma. Además, un grupo muy similar al grupo de genes miR15/miR16 (pero con precursores diferentes) se había comunicado en el cromosoma 3q25-26.1 (véase Lagos-Quintana, y col., Curr. Biol. 12:735-739(2002)). Para mostrar que la variación en la expresión génica miR15/16 estaba relacionada estrictamente con las eliminaciones en el gen 13q, se diseñaron sondas específicas para el ARN precursor de miR16 en el cromosoma 13 y para el ARN precursor de miARN producido por el gen en el cromosoma 3 y se utilizaron para las sondas en transferencia de Northern.

Mientras se detectó el ARN precursor de miR16 del cromosoma 13 a bajos niveles, no se encontró hibridación específica con la sonda del cromosoma 3 en las mismas muestras. Además, se llevó a cabo un estudio LOH con dos microsatélites marcadores que abarcaban una región de 2 Mb localizada inmediatamente centromérica a este grupo. Cuatro de las 17 muestras informativas mostraban LOH en al menos un marcador, y no se encontró correlación con los niveles de expresión de miR15/16. Estos datos demostraban claramente que la regulación negativa de la expresión génica de miR15 y miR16 en CLL se correlaciona con la pérdida alélica en 13q14, y proporciona la prueba de un papel de los productos génicos miR15 y miR16 en la patogénesis de la CLL.

Ejemplo 4: Los miR15 y miR16 también están implicados en la patogénesis de CLL en ratones

Para investigar más si los genes miR15 y miR16 estaban implicados en la patogénesis de la CLL, se extendieron los estudios a ratones transgénicos E μ -TCL1, que desarrollan CLL (Bichi, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(10):6955-6960(2002)). Se examinaron alteraciones génicas y citogénicas en los ratones transgénicos E μ -TCL1. Se llevaron a cabo los análisis de transferencia de Northern como se ha descrito anteriormente (véase Ejemplos – “Transferencia de Northern”, y el Ejemplo 3).

En aproximadamente el 80 % de los ratones transgénicos, había un descenso de la expresión de los análogos del ratón de miR15 y miR16 en las células CLL, al compararse con los linfocitos esplénicos normales de ratón. Estos resultados son similares a los descritos en el Ejemplo 3 para la expresión de miR15 y miR16 en la CLL humana y las muestras normales.

Se hicieron comparaciones entre el cromosoma 15 de ratón y el cromosoma 12 humano. La hibridación génica comparativa (CGH) de las leucemias de ratones transgénicos mostraba que aproximadamente el 35 % tenía una amplificación de una región del cromosoma 15 de ratón, que corresponde con una región del cromosoma 12 humano. Los análisis citogenéticos de estas leucemias de ratón también mostraban trisomías o tetrasomías del cromosoma 15 de ratón. Se sabe que existen trisomías del cromosoma 12 humano en aproximadamente el 25 % de las CLL humanas.

La hibridación génica comparativa también mostraba una pérdida de una región del cromosoma 14 de ratón (51,6-78,5 Mb), que corresponde a la región 13q14 en los seres humanos.

5 Los resultados de los estudios indican que el modelo de CLL de ratón reproduce los acontecimientos que se producen en la patogénesis de la CLL humana.

En conjunto, los datos presentados en los Ejemplos 1-4 proporcionan la prueba de un papel de miR15 y miR16 en la patogénesis de CLL en mamíferos.

10 Se utilizaron las siguientes técnicas en los Ejemplos 5-8:

Muestras de Pacientes

15 Se obtuvieron veintiséis muestras de CLL, tras el consentimiento informado, de pacientes diagnosticados de CLL en las instituciones del Consorcio de Investigación. En resumen, se obtuvo sangre de pacientes de CLL, y se aislaron las células mononucleares por medio de centrifugación en gradiente Ficoll/Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech) y se procesaron para la extracción de ARN según los protocolos descritos (Sambrook J., y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab, Press, Plainview, NY (1989)). Se utilizaron dos grupos normales que contenían células CD5 positivas de cada uno de los dos individuos normales diferentes. Se prepararon las células B CD5+ a partir de linfocitos tonsilares. En resumen, se obtuvieron las tonsilas de pacientes en el grupo pediátrico (menos de 18 años de edad), que se habían sometido a tonsilectomía de rutina, tras un consentimiento informado. 20 Las poblaciones de células B purificadas se prepararon rodeando en roseta las células T de las células mononucleares (MNC) con eritrocitos de oveja tratados con neuraminidasa (SRBC). Con el fin de obtener células B CD5+, se incubaron las células B purificadas con anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD5, y después con Ig de cabra anti-ratón conjugada con microperlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), como se ha descrito. Las células B CD5+ se seleccionaron positivamente recolectando las células retenidas en la columna magnética MS con el sistema MiniMACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). El grado de purificación de las preparaciones celulares era mayor del 95 %, como se evaluaba por citometría de flujo. 25

30 Transferencia de Western para BCL2

Los niveles de proteína BCL2 se cuantificaron utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BCL2 (Dalco) y se confirmaron utilizando un segundo anticuerpo monoclonal de ratón anti-BCL2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) utilizando los procedimientos de referencia para transferencia de Western (Sambrook, J., y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab, Press, Plainview, NY (1989)). Se llevó a cabo la normalización con anticuerpo monoclonal de ratón anti-Actina (Sigma). Las intensidades de banda se cuantificaron utilizando el ImageQuantTL (Nonlinear Dynamics Ltd.). 35

Extracción de ARN, transferencias de Northern, y experimentos de miARNCHIP

40 Se llevaron a cabo los procedimientos como se ha descrito (Calin, G. A., y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 15524-15529 (2002); Liu, C.G., y col., Proc Natl. Acad. Sci U.S.A. 101:9740-9744 (2004); Calin, G. A., y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 11755-11760 (2004)). En resumen, las dianas marcadas de 5 µg de ARN total se utilizaron para hibridación en cada chip micromatriz miARNCHIP que contenía 368 sondas por triplicado, que correspondían a 245 genes miARN humanos y de ratón. Los datos brutos se normalizaron y se analizaron con el software GeneSpring® version 7.2 (Silicon Genetics, Redwood City, CA). Los datos de la expresión se centraron en la media utilizando la opción de normalización de GeneSpring® o la normalización Global Median del paquete Bioconductor (www.bioconductor.org) sin una diferencia sustancial. Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo utilizando la herramienta ANOVA GeneSpring® y el software SAM (Análisis de Significancia de Micromatrices, www.stat.stanford.edu/~tibs/SAM/index.html). Los datos de la micromatriz se confirmaron con transferencias de Northern para *mir-16-1* y *mir-15a*, como se comunica en Calin, G.A., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 11755-11760 (2004). 45 50

Vectores de expresión mir-16-1/mir-15a

55 Se construyeron vectores de expresión *mir-16-1/mir-15a* tipo silvestre (*mir-16-1-WT*) y mutante (*mir-16-1-MUT*) uniendo la fase de lectura abierta relevante con orientación en sentido en el vector de expresión de mamíferos, pSR-GFP-Neo (OligoEngine, Seattle, WA). Cada construcción contenía una secuencia genómica de 832 pb que incluía tanto el *mir-16-1* como el *mir-15a*. La construcción mutante contenía una sustitución de C en T en +7 pares de bases en la región 3' de miR-16-1. Tras la confirmación por secuenciación, cada construcción se transfectó en 293 células utilizando Lipofectamina 2000, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión de ambas construcciones se evaluó por análisis de transferencia de Northern, como se ha descrito en el Ejemplo 5. Se utilizó el análisis de transferencia de Western de los niveles de GFP para mostrar que tanto las construcciones pRSneo-GFP tipo silvestre y mutante se transfectaron con igual eficacia. 60 65

Ensayos de transfección

Las células humanas megacariocíticas (MEG-01) se cultivaron en medio RPMI-1640 con un 10 % de FBS, suplementado con 1x aminoácidos no esenciales y 1 mmol de piruvato sódico, a 37 °C en atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO₂. Las células se co-transfectaron en placas de 12 pocillos utilizando siPORT neoFX (Ambion), según las instrucciones del fabricante, utilizando 0,4 µg de vector indicador de luciferasa de luciérnaga (Promega) y 0,08 µg de vector control que contenía luciferasa de Renilla, pRLTK (Promega). Se utilizaron para cada pocillo, 10 nM de miR-16-1 en sentido (5'-uagcagcacguaaauauuggcg-3'; SEQ ID NO: 341) y/o miR-15a- en sentido (5'-uagcagcacauaaugguuug-3'; SEQ ID NO: 342) (Dharmacon), o inhibidor del precursor miARN miR-15a-antisentido y/o miR-16-1-antisentido (Ambion). Se midieron las actividades de la luciferasa de luciérnaga y renilla, consecutivamente, utilizando un ensayo de luciferasa Dual (Promega), 24 horas tras la transfección.

Experimentos de Luciferasa indicadora

Para generar construcciones indicadoras de luciferasa, se amplificó un segmento de 546 pares de bases de la 3' UTR del gen BCL2 a partir del ADN genómico humano por PCR y se insertó en un vector de control pGL3 (Promega), utilizando el sitio XbaI inmediatamente corriente abajo del codón de parada de luciferasa. Se utilizó el siguiente grupo de cebadores para generar los fragmentos específicos:

BCL2-UTRF2
5'-CTAGTCTAGAGCCTCAGGGAACAGAATGATCAG-3' (SEQ ID NO: 343); y

BCL2-UTRR2
(5'-CTAGTCTAGAAAGCGTCCACGTTCTTCATTG-3'; SEQ ID NO: 344).

Se generaron también dos inserciones BCL2 con eliminaciones de 5 pb y 9 pb del sitio de complementariedad en miR-15a y miR-16-1, respectivamente (véase la FIG. 4A), utilizando el kit de mutagénesis dirigido al sitio QuikChange XL (Stratagene). Se confirmaron por secuenciación las inserciones de tipo silvestre y mutante.

Ejemplo 5: miR-15a y miR-16-1 muestran complementariedad con una región de la transcripción BCL2 y muestra patrones de expresión que se correlacionan inversamente con las de la proteína BCL2

Se identificaron dos microARN, mir-16-1 y mir-15a que tenían una homología con la secuencia ARNm BCL2, por búsqueda de homología. Específicamente, los 9 primeros nucleótidos en el extremo 5' de ambos miARN eran complementarios a las bases 3741 a 3749 de un clon ADNc Bcl2, NM_000633 (FIG. 4A). Esta región de nucleótidos en las transcripciones BCL2 se conserva en los ratones (FIG. 4A). También se identificaron el miR-15b y miR-16-2, ambos miembros de un segundo grupo del cromosoma 3q26, que tenían complementariedad en la misma región de las transcripciones Bcl2.

Para evaluar si los miARN mir-16-1 y/o mir-15a interactuaban con la transcripción BCL2, los inventores determinaron primero si existía una correlación entre los niveles de expresión de miR-15a/miR-16-1 y los niveles de proteína Bcl2 tanto en células de CLL como linfocitos normales CD5 positivos. En los linfocitos B normales CD5 positivos, el grupo del cromosoma 13q14 se expresa altamente, mientras que miR-15b y miR-16-2 apenas se detectan con el análisis de transferencia de Western (Calin, G.A., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15524-15529 (2002)). Por análisis miARNCHIP y transferencia de Western, se analizó un grupo de 30 muestras, que comprendían 26 muestras de CLL y 4 de linfocitos normales CD5 positivos de tonsilas de individuos no afectados. En las células linfoides normales CD5 positivos, los niveles de ambos miARN miR-15a y miR-16-1 eran altos. Por el contrario, la proteína Bcl2 se expresaba a niveles bajos. Sin embargo, en la mayoría de las células leucémicas, tanto miR-15a como miR-16-1 se expresaban a bajos niveles, mientras que la proteína Bcl2 se sobre-expresaba (FIG. 4B y Tabla 4). Además, en todas las muestras de leucemia que se analizaron, los inventores encontraron una correlación inversa entre los niveles de expresión de miR-15a/ miR-16-1 y los de Bcl2 (Tabla 4). Por lo tanto, en las muestras de CLL, se observaba generalmente una regulación negativa de la expresión de miR-15a y miR-16-1 y una sobre-expresión de la proteína Bcl2.

Tabla 4-Valores normalizados de la expresión de la proteína Bcl2 por transferencia de Western y expresión de miR-15a y miR-16-1 por miARNCHIP en un grupo de 26 muestras de CLL y dos grupos de células normales CD5*.

Nombre Sa	Bcl2/ACT	chip mir-16-1	chip mir-15a	mir16/Bcl2/ACT	mir15/Bcl2/ACT
N1-N2	0,06	9	3,5	142,08	55,25
N1-N2	0,05	9	3,5	169,27	65,83
N3-N4	0,07	6,24	2,3	83,58	30,81
CLL1	0,61	4,28	1,11	7,04	1,82
CLL2	1,02	2,65	1,17	2,61	1,15
CLL3	0,17	3,08	1,12	18,40	6,69

CLL4	0,67	2,65	1,17	3,96	1,75
CLL5	0,67	3,27	1,3	4,88	1,94
CLL6	2,95	1,42	1,02	0,48	0,35
CLL7	1,92	3,53	1,51	1,84	0,79
CLLS	1,27	4,34	1,24	3,43	0,98
CLL8	1,50	4,3	1,26	2,86	0,84
CLL9	2,26	2,5	1,1	1,11	0,49
CLL10	3,53	1,17	0,91	0,33	0,26
CLL11	2,50	1,2	1,01	0,48	0,40
CLL12	10,26	1,57	1,16	0,15	0,11
CLL13	7,85	1,8	1,17	0,23	0,15
CLL14	2,86	3,28	0,99	1,15	0,35
CLL15	1,28	9,1	2,62	7,09	2,04
CLL16	14,60	2,2	1,15	0,15	0,08
CLL17	0,99	1,54	1,08	1,55	1,09
CLL18	7,00	1,46	1,07	0,21	0,15
CLL19	1,97	2,71	1,22	1,37	0,62
CLL20	0,56	3,08	1,12	5,50	2,00
CLL21	0,65	2,43	1,26	3,71	1,93
CLL22	0,79	3,08	1,13	3,92	1,44
CLL23	1,30	2,2	1,15	1,69	0,88
CLL21	1,88	0,92	0,87	0,49	0,46
CLL25	8,48	5,03	1,66	0,59	0,20
CLL26	0,17	7,64	1,69	43,70	9,67

* - N1, N2, N3 y N4 = muestras CD5 normales; CLL1-CLL26 = muestras de leucemia linfocítica crónica. Los datos se presentan como unidades arbitrarias. Dos muestras, por ejemplo, una del grupo normal y muestra de CLL8 se ensayaron por duplicado para evaluar la reproducibilidad de los datos. Las intensidades de las bandas en la transferencia de Western (TW) se cuantificaron utilizando ImageQuantTL (Nonlinear Dynamics Ltd.). Los datos de expresión se centraron en la media utilizando tanto la opción de normalización GeneSpring como la normalización media Global del paquete Bioconductor (www.bioconductor.org) sin ninguna diferencia sustancial,

Ejemplo 6: Expresión de los microARN, miR-15a y miR-16-1, reduce la expresión de proteína Bcl2 en células MEG-01 transfectadas

5 Para investigar los efectos de la expresión del grupo completo que contiene miR-15a/ miR-16-1 sobre la expresión de Bcl2, se utilizaron células MEG-01, una línea celular derivada de la leucemia aguda que expresa altas cantidades de Bcl2 pero que no expresan ni miR-15a ni miR-16-1 debido a una eliminación en un alelo y la alteración del otro alelo del locus miR-15a/16-1. Las células MEG-01 se transfectaron transitoriamente con el vector pSR-miR-15/16-WT mostraban niveles muy reducidos de Bcl2 (aproximadamente un 7 % de la expresión normalizada), con respecto
10 a las células MEG-01 de tipo silvestre (MEG-01 WT) y las células MEG-01 que se transfectaron con el vector vacío (MEG-01-pRS-neo-GFP) (FIG. 5A). Para confirmar este efecto, se transfectaron con el mismo vector de expresión que contenía una sustitución +7 (C por T) de la línea germinal en miR-16-1 (pSR-miR-15/16-MUT), que se había detectado en un caso de CLL familiar (Calin, G.C., y col., N. Engl. J. Med. 2005, oct 27; 353 (17): 1793-1801) y reduce fuertemente la expresión de ambos miARN. Como se esperaba, los niveles de Bcl2 eran comparables (75 %
15 de la expresión normalizada) con las células WT y las células de control que se habían transfectado con el vector vacío (FIG. 5A). Además, las células transfectadas con pSR-miR-15a/16-1WT mostraban la activación de una ruta de apoptosis intrínseca (como se determinó por la activación de la ruta APAF1 – caspasa 9 – PARP). Ninguno de las muestras de control, incluyendo la muestras de células transfectadas con la construcción mutante (pSR-miR-15/16-MUT), mostraba cambios en los niveles de estas proteínas pro-apoptóticas (FIG. 5A).
20

Para determinar si ambos miARN miR-15a y miR-16-1 afectan la expresión de Bcl2, los inventores transfectaron transitoriamente oligonucleótidos ARN miR-15a y miR-16-1 sentido o antisentido en células MEG-01. Como se muestra en la FIG. 5B, las transfecciones separadas de oligonucleótidos miR-15a en sentido y miR-16-1 en sentido abolía completamente la expresión de Bcl2, mientras que la transfección de los ARN antisentido de ambos miARN
25 no afectaba a la expresión de Bcl2. Se obtuvieron resultados similares cuando se co-transfectaban ambos ARN en sentido y ambos ARN antisentido (FIG. 5B), confirmando que ambos miARN miR-15a y miR-16-1 tienen influencia en la expresión de la proteína Bcl2.

Ejemplo 7: Evidencia de la interacción directa entre los microARN, mir-15a y miR-16-1, y la 3' UTR de transcripciones BCL2

La regulación negativa de los niveles de proteína Bcl2 que sigue a la expresión de miR-15a y miR-16-1 se podría explicar por un efecto directo (es decir, por hibridación de los miARN directamente a la transcripción Bcl2 por medio de complementariedad miARN::ARNm), o por una interacción indirecta (es decir, la interacción de miR-15a y miR-16-1 con otra diana(s), resultando de esta manera en regulación negativa de los niveles de Bcl2). Para distinguir entre estas posibilidades, se fusionó una secuencia de 536 pb de la 3'UTR de Bcl2 humano (nucleótidos 3064 a 3599 de la SEC ID N° 55), que muestra complementariedad con los microARN miR-15a y miR-16-1, con un gen indicador luciferasa. La interacción entre cualquier miARN y el ARNm BCL2 debería reducir la actividad de la luciferasa de luciérnaga (normalizada con la actividad de luciferasa Renilla del plásmido de transfección de control), mientras que el fallo en la interacción de cualquier miARN con el ARNm BCL2 no debería afectar la expresión del gen indicador. Los datos presentados en las FIG. 6A y 6B son consistentes con una interacción directa entre los miARN miR-15a / miR-16-1 y la transcripción BCL2, ya que se observó una represión significativa de la actividad de la luciferasa después de la transfección con cualquiera o ambos microARN, con respecto a los vectores de control. Se llevó a cabo un experimento de control utilizando dos tipos de secuencias de ARNm mutados diana que carecían de 9 (3'M1) o 5 (3'M2) de las bases de miR-15a y miR-16-1 que son complementarias al ADNc BCL2. Como se esperaba, ambos mutantes abolían completamente la interacción entre miR-15a y miR-16-1 y la 3' UTR de BCL2 (FIG. 6B). Estos datos indican que ambos microARN miR-15a y miR-16-1 interactúan directamente con la 3' UTR de BCL2.

Las translocaciones que afectan al gen BCL2 aumentan ambos niveles del mensajero y la proteína (Tsujimoto, Y., y col., Science 228: 1440-1443 (1985)). Debido a que se ha demostrado recientemente que los miARN pueden regular negativamente una diana específica afectando la traducción del ARNm o la estabilidad del ARNm (Lim, L.P., y col., Nature 433: 769-773 (2005)), se ensayó la posibilidad de que BCL2 se regule negativamente por la interacción de miR-15a/16-1 por medio de la estabilidad del ARNm. Se evaluaron los niveles de ARNm BCL2 por amplificación RT-PCR utilizando extractos de las células que se habían transfectado o bien con pSR-miR-15/16-WT o con oligonucleótidos específicos miR-15a y miR-16-1. No se observaron diferencias en el nivel de la expresión de Bcl2 entre las células de control (por ejemplo, las células no transfectadas o las células transfectadas con el vector vacío) y las células transfectadas con cualquiera de estas construcciones (FIG. 6A), Estos resultados indican que miR-15a y miR-16-1 no afectan la estabilidad del ARNm, sino que es más probable que afecte la traducción del ARNm Bcl2.

Ejemplo 8: Identificación de las supuestas interacciones microARN/BCL2

En el genoma humano están presentes cuatro miembros de la familia mir15/16 y todos tienen la misma secuencia de 9 pb que es complementaria a una región de transcripciones BCL2. Esta redundancia funcional sugiere la existencia de un mecanismo muy fino para regular la expresión de BCL2. Además, utilizando un software de previsión (TargetScan (Lewis, B.P., y col., Cell 120: 15-20 (2005))), se identificó BCL2 como una diana potencial para 14 miARN diferentes, incluyendo mir15 y mir16 (Tabla 5). Estos hallazgos sugieren que otros microARN pueden regular la expresión de la proteína Bcl2 en varios tipos celulares.

Tabla 5. Interacciones miARN::BCL2 previstas por diferentes programas de predicción de dianas*

Intervalo	microARN	TargetScanS (valor de p)	PicTar (puntuación)	Miranda (predicción)
1	mir-182	0,031	4,79	N/D
2	mir-181	0,041	N/D	N/D
3	mir-30	0,065	N/D	N/D
4	mir-15	0,091	2,08	N/D
5	mir-16	0,091	2,08	N/D
6	mir-195	0,091	2,12	N/D
7	mir-34	0,15	1,34	Sí
8	mir-153	0,24	0,64	N/D
9	mir-21	0,33	0,64	N/D
10	mir-217	0,36	2,37	N/D
11	mir-205	0,37	N/D	N/D
12	mir-204	0,4	0,73	Sí
13	mir-211	0,4	0,73	Sí
14	mir-143	0,41	3,86	N/D
15	mir-96	N/D	1,77	N/D
16	mir-103	N/D	1,23	N/D

17	mir-107	N/D	1,23	N/D
18	mir-129	N/D	N/D	Sí
19	mir-9	N/D	N/D	Sí
20	mir-137	N/D	N/D	Sí
21	mir-217	N/D	N/D	Sí
22	mir-186	N/D	N/D	Sí

Nota: TargetScan (MIT) en genes.mit.edu/targetscan/, PicTar (Universidad de Nueva York) en pictar.bio.nyu.edu/ y Miranda (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) en www.microrna.org/.
N/D – predicción no disponible.

Los datos proporcionados en el presente documento indican que la sobre-expresión de Bcl2 como consecuencia de la regulación negativa de un microARN (por ejemplo, miR-15a, miR-16-1) es un importante mecanismo que contribuye a la patogénesis de la CLL-B humana. De manera notable, la regulación negativa de miR-15a y miR-16-1 también se ha comunicado en casos de linfomas de células B grandes difusos (DLBCL) (Eis, P.S., y col., Proc Natl. Acad. Sci. USA 102: 3627-3632 (2005)). Por lo tanto, la sobre-expresión de Bcl2 como consecuencia de la regulación negativa de microARN (por ejemplo, miR-15a, miR-16-1) es probable que esté implicada en otras enfermedades humanas malignas.

10 Ejemplo 9: Expresión de los productos génicos miR en células humanas

Las secuencias de ADNc que codifican uno o más ARN precursores de miR entero se clonan separadamente en el contexto de un ARNm irrelevante bajo el control del promotor precoz intermedio de citomegalovirus (CMV-IE), según el procedimiento de Zeng, y col., Mol. Cell 9:1327-1333 (2002).

En resumen, los enlazadores Xho I se colocaron en el final de las secuencias de ADNc de doble cadena que codifican los precursores miR, y estas construcciones se clonaron separadamente en el sitio Xho I presente en el plásmido pBC12/CMV. El plásmido pBC12/CMV se describe en Cullen, (1986), Cell 46: 973-982. El plásmido que contiene las secuencias del ARN precursor de miR se llama pCMV-miR (por ejemplo, pCMV-miR16 para miR-16-1).

Una o más construcciones pCMV-miR se transfectaron separadamente en células 293T humanas cultivadas por técnicas de referencia utilizando el reactivo FuGene 6 (Roche). Se extrajo el ARN total como se ha descrito anteriormente, y se detectó la presencia de microARN procesado por análisis de transferencia de Northern con sondas específicas de miR.

Una o más construcciones pCMV-miR también se transfectaron separadamente en líneas celulares de cáncer humano (por ejemplo, las líneas celulares de carcinoma 2220, 2221, 11609, 11611, LNCAP, TSUR). Se extrajo el ARN total como se ha descrito anteriormente, y se detectó la presencia de microARN procesado en las células de cáncer por análisis de transferencia de Northern con sondas específicas de miR. También se evaluaron las células transfectadas en cuanto a cambios en la morfología, la capacidad de superar la inhibición por contacto, y otros marcadores indicativos de un fenotipo transformado.

Ejemplo 10: Transfección de las células madre hematopoyéticas con productos génicos miR

Las células de un cáncer asociado con BCL2 de un sujeto diagnosticado con un cáncer asociado con BCL2 se aislaron y se transfectaron con plásmidos que codifican uno o más microARN de la siguiente manera.

Se aislaron células B CD5+ como se ha descrito anteriormente y se identificaron células de cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, células de CLL) por inspección visual o, si el cáncer es CLL, por determinación de la puntuación para CLL según el sistema de puntuación de Matutes, y col., Leukemia 8(10):1640-1645 (1994). Las células B CD5+ con una puntuación CLL de al menos 4 se consideran células CLL.

Las células de un cáncer asociado con BCL2 aisladas se transfectaron con construcciones de expresión miR (por ejemplo, pCMV-miR15, pCMV-miR16) por técnicas de referencia. Se extrajo el ARN total como se ha descrito anteriormente, y se detectó la presencia de microARN procesado por el análisis de transferencia de Northern con sondas específicas para miR particulares (por ejemplo, miR-15a, miR-16-1). También se confirmó la integración estable de las secuencias génicas miR por hibridación transferencia de Southern utilizando sondas específicas para ciertas secuencias génicas miR.

50 Ejemplo 11: Transfección de células madre hematopoyéticas con productos génicos miR

Se obtuvieron células madre hematopoyéticas (HSC) de sujetos diagnosticados con un cáncer asociado con BCL2 (por ejemplo, CLL) de la médula ósea de la siguiente manera.

Se recolectó la médula ósea de los huesos ilíacos de un sujeto bajo anestesia general en un quirófano utilizando técnicas de referencia. Se tomaron múltiples aspiraciones en jeringas heparinizadas hasta un total de aproximadamente 750 a 1000 ml de médula ósea. La médula aspirada se transfirió inmediatamente a un medio de transporte (TC-199, Gibco, Grand Island, New York) que contenía 10.000 unidades de heparina libre de conservantes por 100 ml de medio. La médula aspirada se filtró a través de tres filtros progresivamente más finos para obtener una suspensión celular libre de agregados celulares, detritos y partículas óseas. La médula filtrada se procesó más entonces en un separador automático de células (por ejemplo el procesador celular Cobe 2991 para obtener la "capa leucocitaria" (es decir, los leucocitos libres de glóbulos rojos y plaquetas).

La preparación de la capa leucocitaria se enriqueció parcialmente de las células madre hematopoyéticas (HSC) seleccionando positivamente células CD34+ con perlas inmunomagnéticas (Dynal A.S., Oslo, Noruega) de la siguiente manera. Se suspendió la preparación de la capa leucocitaria en medio alfa suplementado y se incubó con anticuerpo de ratón anti-HPCA-I en una dilución 1:20, 45 minutos, a 4 °C con inversión suave de los tubos. Las células se lavaron 3x en medio alfa suplementado, y luego se incubaron con perlas revestidas con el fragmento Fc de cabra anti-ratón de IgG₁ (75 µl de inmunoperlas/10⁷ células CD34+). Después de 45 minutos de incubación a 4 °C, las células adherentes a las perlas se seleccionaron positivamente utilizando un concentrador de partículas magnético, según las directrices del fabricante.

Se incubaron 2x10⁴ células de la preparación enriquecida de HSC en tubos de polipropileno de 5 ml (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) con un volumen total de 0,4 ml de medio Dulbecco modificado según Iscove (IMDM) que contenía un 2 % de suero humano AB y 20 mM de tampón Hepes, y se transfectaron con construcciones que expresan miR (por ejemplo, pCMV-miR15, pCMV-miR16) por técnicas de referencia. Se confirmó la expresión de microARN en una parte de las HSC por el análisis de transferencia de Northern, y se confirmó la integración estable de las secuencias génicas miR en una parte de la HSC por análisis de transferencia de Southern. Se implantaron aproximadamente 4 x 10⁸ /kg de peso corporal a aproximadamente 8 x 10⁸ /kg de peso corporal de las células transfectadas restantes en un sujeto según las técnicas de trasplante de médula de referencia.

Se repitió el experimento, pero la médula ósea se purgó de células neoplásicas por radiación ionizante antes de la transfección y la reimplantación, de la siguiente manera. Las células de la capa leucocitaria se ajustó a una concentración celular de aproximadamente 2 x 10⁷/ml en TC-199 que contenía aproximadamente un 20 % de plasma autólogo. Se añadieron los factores de crecimiento hematopoyético recombinantes humanos rH IL-3 o rH GM-CSF a la suspensión celular para estimular el crecimiento de las neoplasias hematopoyéticas y de esta manera aumentar su sensibilidad a la radiación ionizante. Las células se expusieron a 5-10 Gy de radiación ionizante, se lavaron una vez a 4 °C en TC-199 que contenía aproximadamente un 20 % de plasma autólogo, y se transfectaron con construcciones que expresan miR (por ejemplo, pCMV-miR15, pCMV-miR16) como anteriormente.

Ejemplo 12: Preparación de los liposomas que encapsulan los microARN

Preparación de Liposomas 1 – Los liposomas compuestos de lactosil cerebrósido, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina y colesterol en relaciones molares de 1:1:4:5 se prepararon por el método de evaporación en fase inversa descrito en la Patente de EE. UU. Nº 4.235.871. Los liposomas se prepararon en una solución acuosa de 100 µg/ml de microARN procesado o 500 µg/ml (por ejemplo, pCMV-miR-15, pCMV-miR16). Los liposomas preparados de esta manera encapsulan el microARN procesado (por ejemplo, ARN miR-15a, miR-16-1), o las construcciones que expresan microARN (por ejemplo, los plásmidos pCMV-miR15, pCMV-miR 16).

Los liposomas se pasaron entonces a través de una membrana de policarbonato 0,4 y se suspendieron en solución salina, y se separaron del material no encapsulado por cromatografía en columna con cloruro sódico 135 mM, fosfato sódico 10 mM pH 7,4. Se utilizaron los liposomas sin más modificaciones. o se modificaron como se describe a continuación.

Una cantidad de los liposomas preparados anteriormente se cargaron en un matraz de reacción apropiado al que se añadió con agitación, una solución de metaperyodato sódico 20 mM, cloruro sódico 135 mM y fosfato sódico 10 mM (pH 7,4). Se dejó en reposo la mezcla resultante en oscuridad durante 90 minutos a una temperatura aproximada de 20 °C. Se retiró el exceso de peryodato por diálisis de la mezcla de reacción contra 250 ml de solución salina tamponada (135 mM de cloruro sódico, 10 mM de fosfato sódico, pH 7,4) durante 2 horas. El producto es un liposoma que tiene una superficie modificada por oxidación de los grupos hidroxilo de carbohidratos a grupos aldehído. Los grupos dirigidos o los restos de inhibición de la opsonización se conjugan con la superficie del liposoma por medio de estos grupos aldehído.

Preparación de Liposomas 2 – Una segunda preparación de liposomas compuestos por maleimidobenzoil-fosfatidiletanolamida (MBPE), fosfatidilcolina y colesterol se obtienen de la siguiente manera. El MBPE es un fosfolípido activado para el acoplamiento de compuestos que contienen grupo sulfhidrilos, incluyendo proteínas, a los liposomas.

Se disolvió Dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) (100 mmoles) en 5 ml de metanol anhidro que contenía 2 equivalentes de trietilamina y 50 mg de éster de m-maleimidobenzoil N-hidroxisuccinimida, como se describe en

Kitagawa, y col., J. Biochem. 79:233-236 (1976). La reacción resultante se deja proceder bajo atmósfera de nitrógeno durante una noche a temperatura ambiente, y se somete a cromatografía de capa fina sobre gel de sílice en cloroformo/metanol/agua (65/25/4), que revela la conversión cuantitativa del DMPE en un producto de migración más rápida. El metanol se retira bajo presión reducida y los productos se redisuelven en cloroformo. La fase de cloroformo se extrae dos veces con un 1 % de cloruro sódico y la maleimidobenzoil-fosfatidiletanolamina (MBPE) purificada por cromatografía de ácido silícico con cloroformo/metanol (4/1) como disolvente. Después de la purificación la cromatografía indica una mancha que contiene el fosfato único que es ninhidrina negativo.

Los liposomas se preparan con MBPE, fosfatidilcolina y colesterol en relaciones molares de 1:9:8 por el método de evaporación en fase inversa de la Patente de EE. UU. N° 4.235.871, *supra*, en una solución acuosa de 100 µg/ml de microARN procesado o una solución de plásmidos que codifican microARN. Los liposomas se separan del material no encapsulado por cromatografía en columna en 100 mM de cloruro sódico- 2 mM de fosfato sódico (pH 6,0).

Ejemplo 13: Unión de los anticuerpos anti-CD5+ o anti-tumor prostático a los liposomas que encapsulan los productos génicos miR

Un matraz apropiado se carga con 1,1 ml (que contiene aproximadamente 10 mmoles) de la Preparación de Liposomas 1 que tienen grupos reactivos aldehído, o la Preparación de Liposomas 2 anterior. Se añade a la preparación, con agitado, 0,2 ml de una solución de cianoborhidruro sódico y 1,0 ml de una solución de 3 mg/ml de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el marcador de superficie de células CD5+ o contra un antígeno de células tumoral de próstata. La mezcla de reacción resultante se deja reposar durante una noche mientras se mantiene a una temperatura de 4 °C. La mezcla de reacción se separa en una columna de agarosa Biogel A5M (Biorad, Richmond, Ca.; 1,5 X 37 cm).

Ejemplo 14: Inhibición del crecimiento del tumor de próstata humano *in vivo* con productos génicos miR

Una línea celular de adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas (PC-3) se inoculó en ratones desnudos, y los ratones se dividieron en grupos de tratamiento y de control. Cuando los tumores en los ratones alcanzaban 100 a 250 milímetros cúbicos, se inyectaron directamente en el tumor del grupo de tratamiento uno o más microARN procesados (por ejemplo, miR-15a, miR-16-1) encapsulados en liposomas. Los tumores del grupo de control se inyectaron con liposomas que encapsulaban solamente una solución de vehículo. Se midió a través del estudio el tamaño del tumor. La eficacia de los productos génicos miR para inhibir el crecimiento del tumor prostático en el modelo de adenocarcinoma de próstata Dunning R-3327 en rata también se evaluó de la siguiente manera. Se inocularon las células de un clon altamente metastático y maligno (RT-3.1) del adenocarcinoma de próstata Dunning R-3327 en ratas Copenhague, que se dividieron entonces en grupos de tratamiento y de control. Ambos grupos formaron masas de tumores sólidos en una semana aproximadamente. Los tumores de las ratas del grupo de tratamiento se inyectaron entonces con microARN procesados encapsulados en liposomas dos veces a la semana durante 5 semanas. Los tumores del grupo de control se inyectaron con liposomas que encapsulaban solamente solución de vehículo. El volumen tumoral se midió durante el estudio.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto génico miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una transcripción génica BCL2 y que es miR-15a o miR-16-1 para su uso en el tratamiento del cáncer reduciendo la expresión de dicha transcripción génica BCL2 en un sujeto que tiene un cáncer asociado con BCL2 en donde el BCL2 está sobre-expresado, en donde el sujeto está recibiendo al menos un tratamiento contra el cáncer y donde se aumenta la eficacia del tratamiento contra el cáncer.
- 10 2. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID N° 55.
- 15 3. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tratamiento anti-cáncer es la quimioterapia.
- 20 4. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tratamiento anti-cáncer es la terapia por radiación.
- 25 5. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, donde el cáncer es una leucemia linfocítica crónica (CLL).
- 30 6. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, donde el cáncer es un linfoma.
- 35 7. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el linfoma se selecciona de entre el grupo que consiste en linfoma folicular, linfoma de células pequeñas, linfoma de células grandes y linfoma no Hodgkin.
- 40 8. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es un cáncer de pulmón.
- 45 9. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, donde el sujeto es un ser humano.
- 50 10. Un producto génico miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una transcripción génica BCL2 y que es miR-15a o miR-16-1 para su uso en el tratamiento de un cáncer reduciendo la expresión de dicha transcripción génica BCL2 en un sujeto que tiene un cáncer asociado con BCL2 en donde se sobre-expresa BCL2, donde el sujeto está recibiendo al menos un agente anti-cáncer y donde se aumenta la sensibilidad de las células cancerosas al agente anti-cáncer.
- 55 11. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 10, en donde al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID N° 55.
- 60 12. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el sujeto es un ser humano.
- 65 13. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 10 para tratar un cáncer de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la célula cancerosa se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula de CLL, una célula de cáncer de pulmón y una célula de linfoma.
- 70 14. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la célula cancerosa es una célula de linfoma que se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula de linfoma folicular, una célula de linfoma de células pequeñas, una célula de linfoma de células grandes y una célula de linfoma no Hodgkin.
- 75 15. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 10, donde la célula cancerosa es una célula de cáncer de pulmón.
- 80 16. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el cáncer de pulmón es un carcinoma de células no pequeñas.
- 85 17. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la célula cancerosa es una célula que se asocia con un cáncer que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, melanoma, una

enfermedad hematológica maligna, un tumor sólido, cáncer colorrectal, carcinoma cerebral, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, enfermedad linfoproliferativa asociada al virus de Epstein-Barr, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular y carcinoma gástrico.

- 5 18. Un producto génico miR que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una transcripción génica BCL2 y que es miR-15a o miR-16-1 para su uso en el tratamiento de un cáncer reduciendo la expresión de dicha transcripción génica BCL2 en un sujeto que tiene un cáncer asociado con BCL2 en el que se sobre-expresa BCL2, donde se induce apoptosis en una célula cancerosa presente en el sujeto, célula cancerosa se pone en contacto con el producto génico miR.
- 10 19. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 18, donde el al menos un producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos 3741-3749 de la SEC ID N° 55.
- 15 20. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 18, donde la célula cancerosa se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula CLL, una célula de cáncer de pulmón y una célula de linfoma.
- 20 21. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 20 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la célula cancerosa es una célula de linfoma que se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula de linfoma folicular, una célula de linfoma de células pequeñas, una célula de linfoma de células grandes y una célula de linfoma no Hodgkin.
- 25 22. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 20 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la célula cancerosa es una célula de un cáncer de pulmón.
- 30 23. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 22 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el cáncer de pulmón es un carcinoma de pulmón de células no pequeñas.
- 35 24. Un producto génico miR de acuerdo con la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la célula cancerosa es una célula que se asocia con un cáncer que se selecciona de entre el grupo que consiste en leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, melanoma, una enfermedad hematológica maligna, un tumor sólido, cáncer colorrectal, carcinoma cerebral, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, enfermedad linfoproliferativa asociada al virus de Epstein-Barr, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular y carcinoma gástrico.
- 40 25. Una composición farmacéutica que comprende al menos un agente anti-cáncer y al menos un producto génico miR, en donde el producto génico miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una transcripción génica BCL2 que es miR-15a o miR-16-1 para su uso en el tratamiento de un cáncer reduciendo la expresión de dicha transcripción génica BCL2 en un sujeto que tiene un cáncer asociado con BCL2, en donde se sobre-expresa BCL2, y donde la sensibilidad de las células cancerosas al agente anti-cáncer se aumenta por el producto génico miR.

45

```

          GAGUAAAGUA          UA          GA  U
5' CCUUG          GCAGCACA  AUGGUUUGUG  UUU \
   GGAAC          CGUCGUGU  UACCGGACGU  AAA G
          AUAAAAACUC          UA          GG  A
    
```

FIG. 1A

```

          AG  C          -  A          CGUUA          UCUA
5' GUCAGC  UGC  UUAGCAGCAC  GU  AAUAUUGG          AGAU          \
   CAGUUG  AUG  AGUCGUCGUG  CA  UUAUGACC          UCUA          A
          GA  A          U  A          .....          UUAA
    
```

FIG. 1B

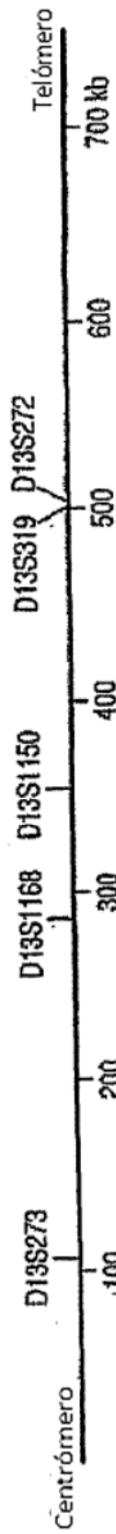


FIG. 2A

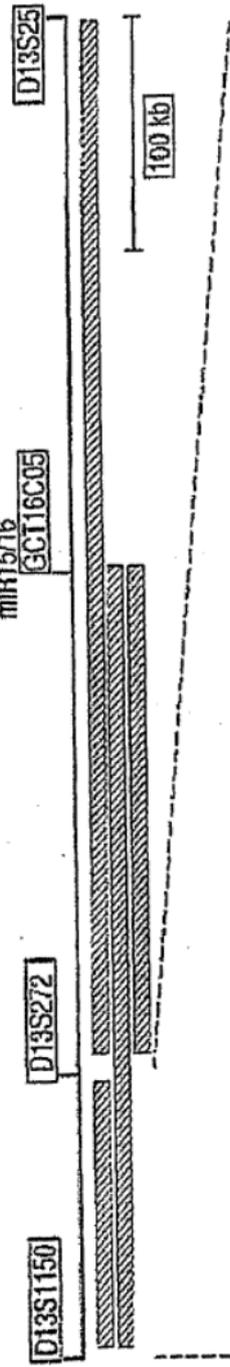


FIG. 2B

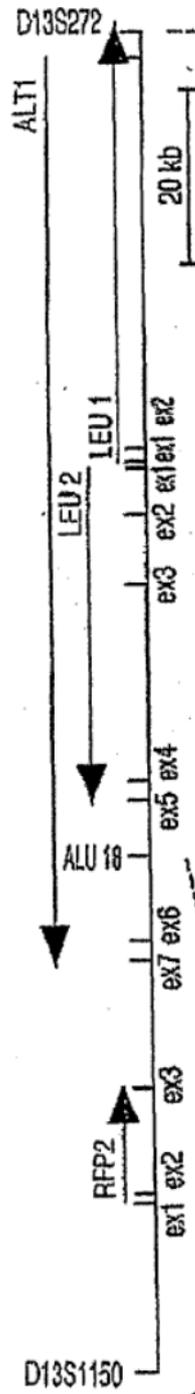


FIG. 2C

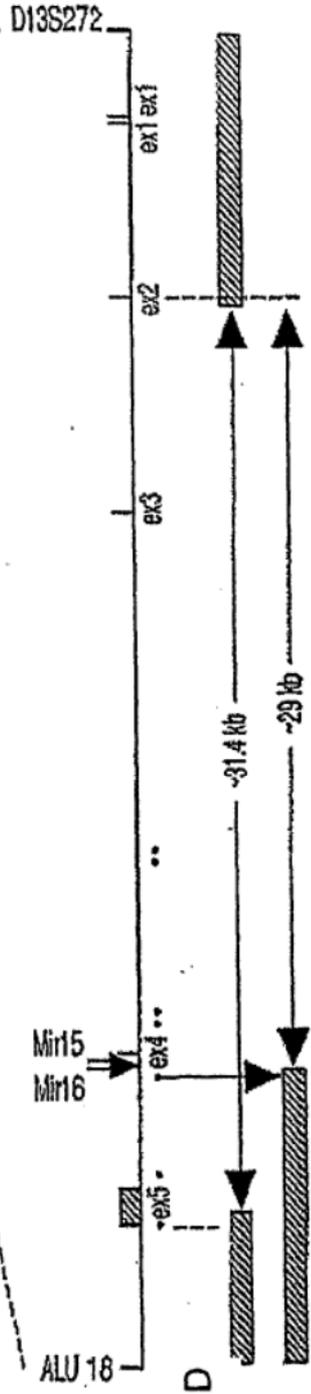


FIG. 2D

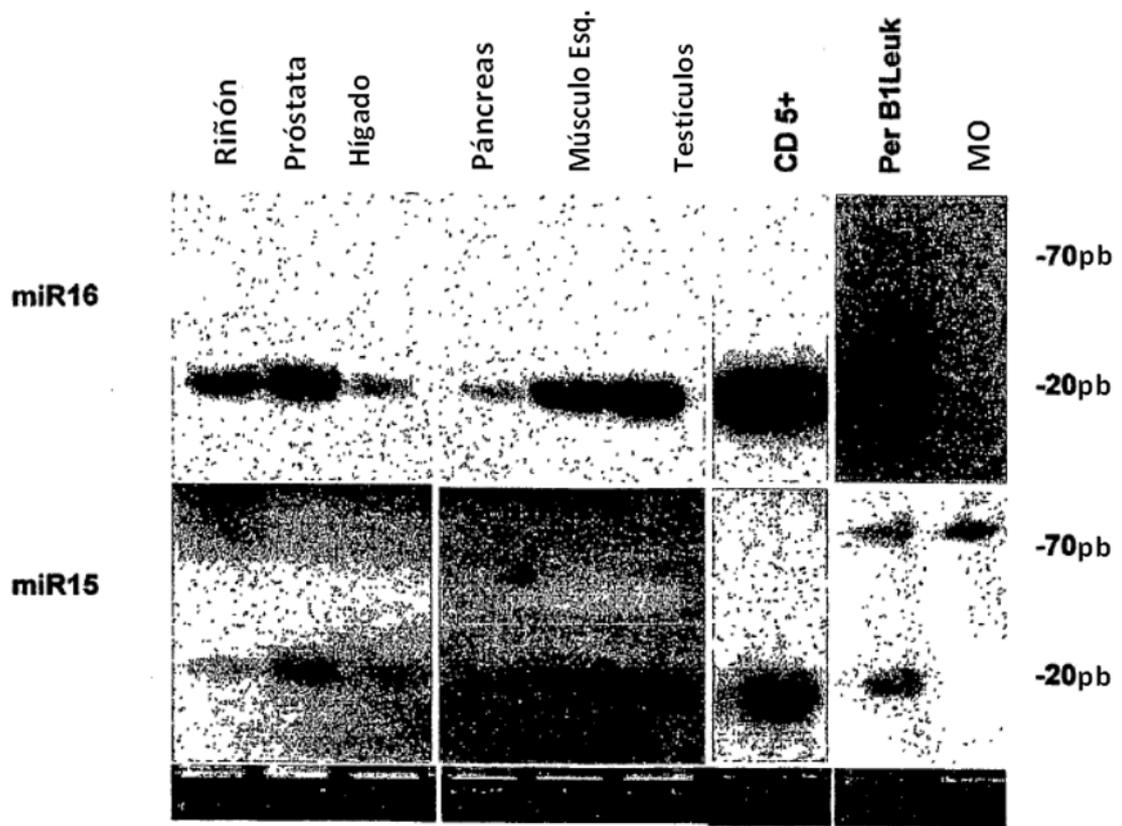


FIG. 3A

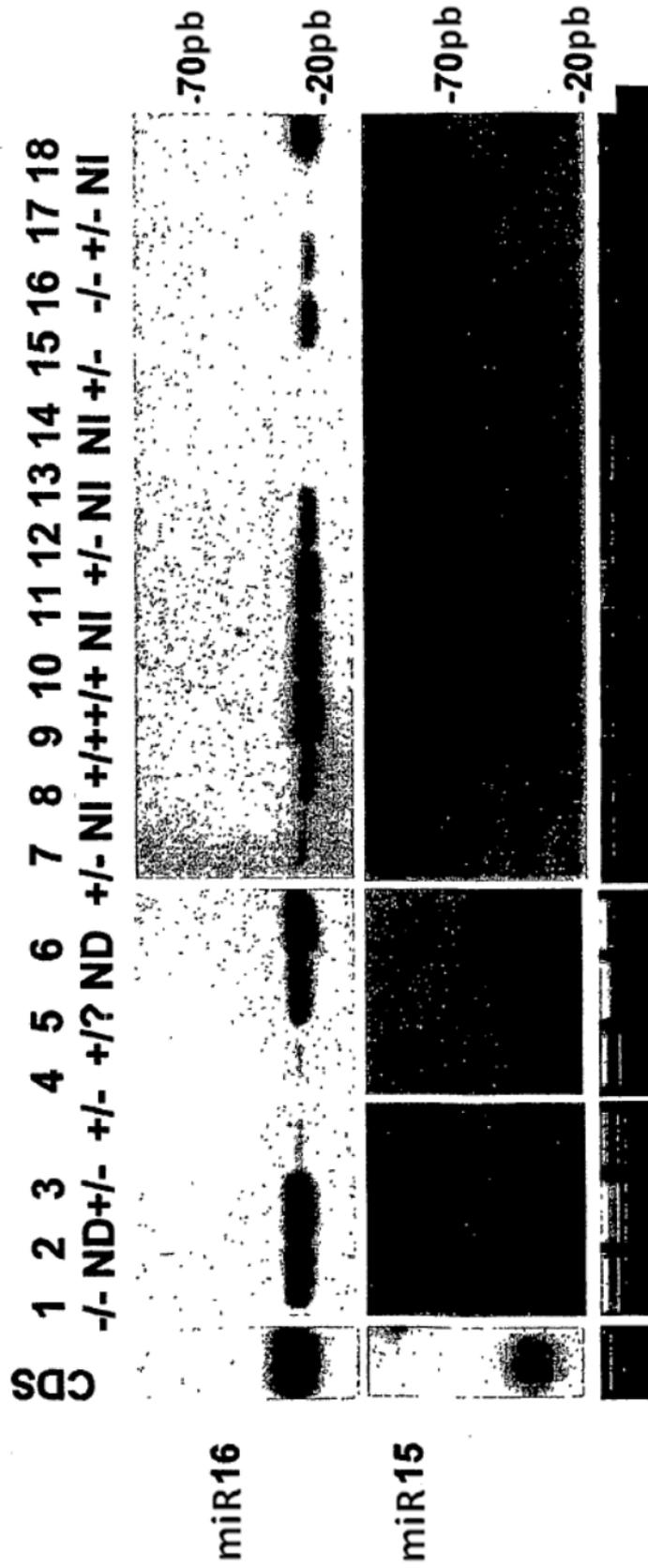


FIG. 3B

	<u>3'M1</u>	
	<u>3'M2</u>	
Hsa_BCL2: 3260-	TATGGAAATATCCCAATCCTGTGCTGCTATCC-3290	
Hsa_mir-15:		
Hsa_mir-16:	GTGTTGGTAATACACGACGAT	
	GCGGTTATAAATGCCACGACGAT	
Mmu_BCL2: 2200-	TGGGGAAGCCTGCAGTC: TG: GCTGCTAGAA-2230	
Mmu_mir-15:		
Mmu_mir-16:	GTGTTGGTAATACACGACGAT	
	GCGGTTATAAATGCCACGACGAT	

FIG. 4A

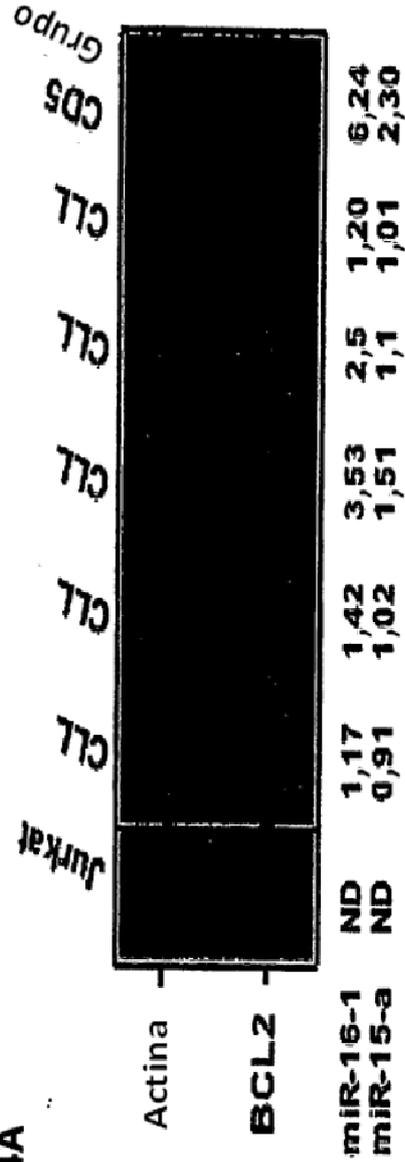


FIG. 4B

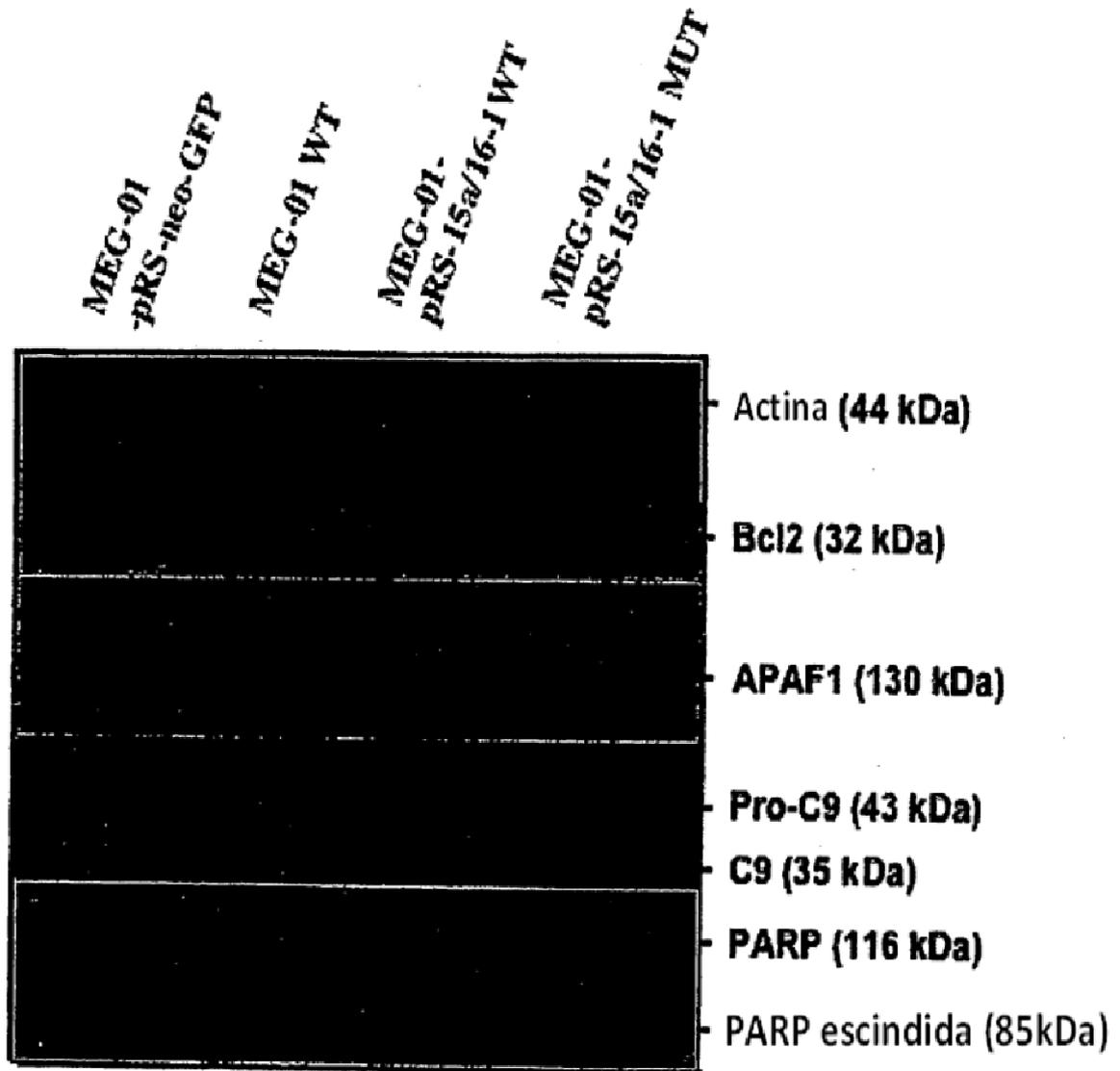


FIG. 5A

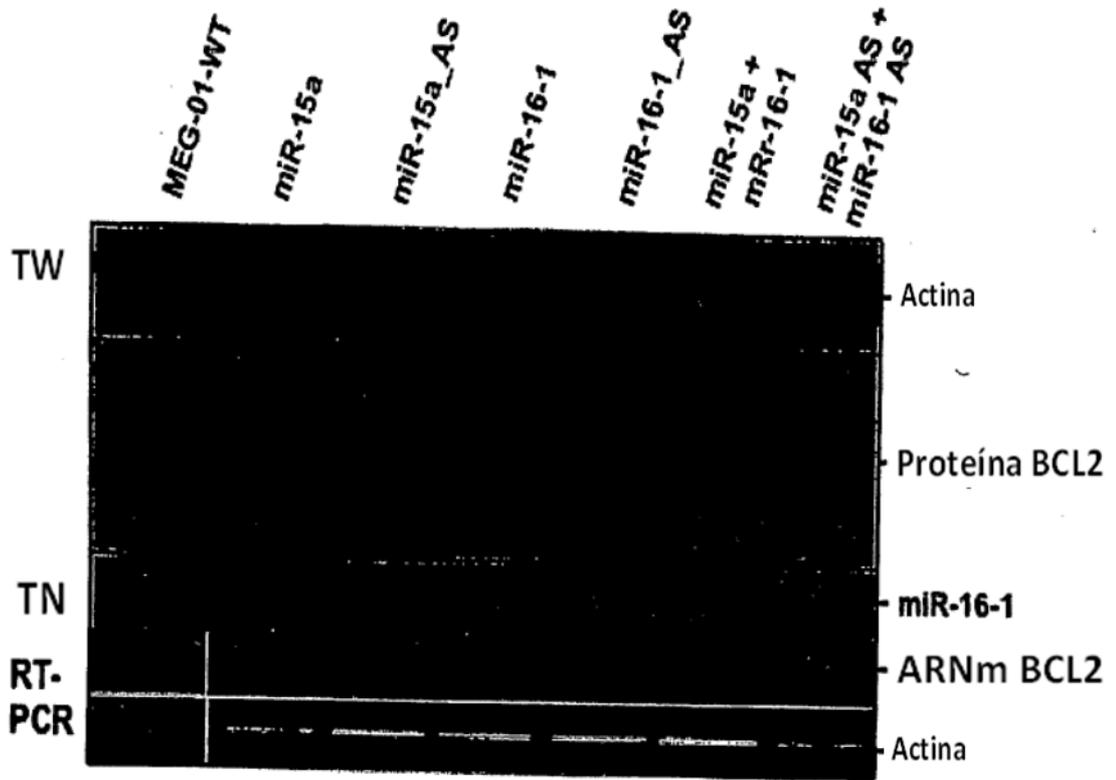


FIG. 5B

