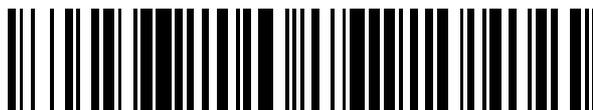


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 078**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 08798444 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2183593**

54 Título: **Métodos y composiciones para inducir la desregulación de la fosforilación de EphA7 y ERK en leucemias agudas humanas**

30 Prioridad:

22.08.2007 US 965757 P

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

02.03.2016

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.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 562 078 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para inducir la desregulación de la fosforilación de EphA7 y ERK en leucemias agudas humanas

5

Campo técnico y aplicabilidad industrial de la invención

La presente invención se refiere generalmente al campo de la biología molecular. Más en concreto, se refiere a métodos y composiciones que implican biomarcadores para las leucemias agudas humanas. Determinados aspectos incluyen la aplicación en el diagnóstico, tratamiento, y pronóstico de las leucemias agudas humanas.

10

Antecedentes de la invención

No se reconoce que los antecedentes descritos en esta sección constituyan legalmente una técnica anterior.

15

Se ha aislado el gen ALL1 (denominado también MLL) en virtud de sus implicaciones en las translocaciones de cromosomas recurrentes que se producen en leucemias agudas, particularmente en leucemias linfoblásticas agudas infantiles (LLA) y en leucemias mieloides agudas relacionadas con tratamiento (11). La translocación de cromosomas da como resultado la fusión del gen ALL1 con uno o más de los 50 genes asociados diferentes y la producción de proteínas leucemogénicas compuestas de la secuencia All1 del extremo N y el extremo C de la proteína asociada (11).

20

La patente de Estados Unidos N.º 5.633.136 de Croce *et al.* describe los polinucleótidos ALL-1 para la detección y el tratamiento de la leucemia. La patente 5.633.136 de Croce *et al.* proporciona métodos para el diagnóstico y el tratamiento de leucemias que implican puntos de rotura en el cromosoma 11, en el locus ALL-1. Se describe también la región del punto de rotura de ALL-1, una región de aproximadamente 8 kb del cromosoma 11. La región ALL-1 está implicada en translocaciones en las leucemias linfocíticas, mielomonocíticas, monocíticas y mielógenas agudas. Se proporcionan también sondas que identifican anomalías cromosómicas que implican la región del punto de rotura de ALL-1 del cromosoma 11. Se proporciona la secuencia de ADNc del gen ALL-1 en el cromosoma 11. Se proporciona también una secuencia parcial del gen AF-4 en el contexto de las secuencias de dos productos finales recíprocos de una translocación. Se proporcionan también las secuencias de aminoácidos que corresponden a las secuencias del ADNc del gen ALL-1 completo y la secuencia parcial del gen AF-4. Se proporcionan sondas para detectar anomalías cromosómicas que implican el gen ALL-1 en el cromosoma 11. Se describen también anticuerpos monoclonales para el diagnóstico y tratamiento, y oligonucleótidos de sentido contrario para el tratamiento de leucemias agudas.

25

30

35

La patente de Estados Unidos N.º 5.567.586 de Croce describe métodos para identificar tumores sólidos con anomalías cromosómicas en la región ALL-1. La patente de Estados Unidos N.º 5.567.586 de Croce proporciona métodos para determinar si un tumor sólido tiene una redistribución del gen ALL-1 o una mutación en el gen ALL-1. Los métodos comprenden las etapas de obtener una muestra de un tumor sólido y detectar la presencia de una redistribución o mutación del gen ALL-1 en una célula en dicha muestra. Las redistribuciones y mutaciones del gen ALL-1 se detectan mediante el análisis de transferencia Southern, el análisis de amplificación mediante la PCR, el análisis de hibridación in situ, el análisis de transferencia Northern o el análisis de la secuencia de ADN.

40

La patente de Estados Unidos N.º 5.633.135 de Croce *et al.* describe ácidos nucleicos y proteínas quiméricas que son el resultado de anomalías cromosómicas en la región ALL-1. La patente 5.633.135 de Croce *et al.* proporciona métodos para el diagnóstico y el tratamiento de leucemias que implican puntos de rotura en el cromosoma 11, en el locus ALL-1. Se describe también la región del punto de rotura de ALL-1, una región de aproximadamente 8 kb del cromosoma 11. La región ALL-1 está implicada en translocaciones en las leucemias linfocíticas, mielomonocíticas, monocíticas y mielógenas agudas. Se proporcionan también sondas que identifican anomalías cromosómicas que implican la región del punto de rotura de ALL-1 del cromosoma 11. Se proporcionan también las secuencias del ADNc del gen ALL-1 en el cromosoma 11, el gen AF-9 en el cromosoma 9 y el gen AF-4, y las correspondientes secuencias de aminoácidos. Se proporcionan sondas para detectar las anomalías cromosómicas que implican estos genes. Se describen los genes quiméricos implicados en las translocaciones. Se describen también anticuerpos monoclonales para el diagnóstico y tratamiento, y oligonucleótidos de sentido contrario para el tratamiento de leucemias agudas.

45

50

55

La patente de Estados Unidos N.º 6.040.140 de Croce *et al.* describe la secuencia del ADNc del gen ALL-1 en el cromosoma. Se proporciona también una secuencia parcial del gen AF-4 en el contexto de las secuencias de dos productos finales recíprocos de una translocación. Se proporcionan también las secuencias de aminoácidos que corresponden a las secuencias del ADNc del gen ALL1 completo y la secuencia parcial del gen AF-4, y las secuencias que se refieren a los genes quiméricos formados por translocaciones cromosómicas con el cromosoma 4, 9 y 19, respectivamente. Se proporcionan también sondas para detectar anomalías cromosómicas que implican el gen ALL-1 en el cromosoma 11, incluyendo sondas para detectar genes quiméricos generados por translocaciones.

60

65

El documento US 2006/166918 se refiere a composiciones y métodos para modular la expresión del gen de fusión MLL-AF4, y más concretamente a la regulación por defecto de MLL-AF4 mediante oligonucleótidos modificados químicamente. Nakanishi *et al.*, PNAS:104(36), 2007, 14442-14447, publicado después de la fecha de prioridad de la presente solicitud describe que las proteínas de fusión de ALL1 inducen la desregulación de la fosforilación de EphA7 y ERK en leucemias agudas humanas.

La redistribución de ALL1 más prevalente en LLA es el gen quimérico ALL1/AF4 resultante de la translocación del cromosoma t(4;11). Esta redistribución conduce a la leucemia de prolinfocitos B y se asocia con un pronóstico muy malo en niños y adultos (12). Las rutas moleculares desreguladas por las proteínas de fusión All1 (14, 21) están solo parcialmente definidas, pero es probable que incluyan proceso(s) implicados en la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas.

A pesar de la considerable investigación en tratamientos, la LLA sigue siendo difícil de diagnosticar y tratar eficazmente, y la mortalidad observada en pacientes indica que se necesitan mejoras en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, se proporciona en el presente documento un método para identificar la presencia de proteínas de fusión ALL1 en las células en una muestra de un sujeto, en el que el método comprende medir el nivel de la expresión de EphA7 en las células. En una realización particular, las proteínas de fusión ALL1 son proteínas de fusión ALL1/AF4 y ALL1/AF9. El nivel de expresión de EphA7 se puede medir mediante PCR.

Se describe también un método para evaluar una dolencia patológica, o el riesgo de desarrollar una dolencia patológica. El método incluye medir un perfil de expresión de uno o más marcadores en una muestra del sujeto, donde una diferencia entre el perfil de expresión en la muestra procedente del sujeto y un perfil de expresión de una muestra normal es indicativo de leucemia linfoblástica aguda (LLA) o una predisposición a LLA. El marcador puede comprender al menos uno o más productos génicos que interfieren con la fosforilación (Erk) y el crecimiento de células que producen la proteína de fusión ALL/AF4.

La evaluación de la dolencia patológica del sujeto incluye predecir una predisposición a desarrollar LLA en un sujeto, diagnosticar un sujeto con LLA, evaluar el pronóstico del sujeto con LLA, o evaluar la respuesta del sujeto con LLA al tratamiento.

La disminución de la expresión de EphA7 directa o la supresión de EphA7 mediada por la disminución de la expresión de All1/AF4 en células leucémicas t(4;11) puede dar como resultado una atenuación de la fosforilación de Erk1/2.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método *in vitro* para reducir la fosforilación de ERK1/2 en células leucémicas que expresan la proteína de fusión ALL1 mediante la supresión de la expresión de EphA7 con un ARNip dirigido contra EphA7.

Se describe también un método para tratar células leucémicas que transportan la t(4;11) que comprende administrar un inhibidor de la fosforilación de Erk que induce la muerte celular apoptótica.

Se describe también en el presente documento un método para regular en exceso la expresión de EphA7 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un producto génico que codifica las proteínas de fusión All1 que regulan en exceso la expresión de EphA7.

Se describe también en el presente documento un marcador para predecir la supervivencia de un sujeto con leucemia linfoblástica aguda (LLA) donde el marcador comprende uno o más productos génicos que interfieren con la fosforilación (Erk) y el crecimiento de células que producen la proteína de fusión ALL/AF4 y un marcador para evaluar una o más rutas metabólicas que contribuyen a al menos uno del inicio, progresión, gravedad, patología, agresividad, grado, actividad, discapacidad, mortalidad, morbilidad, subclasificación de la enfermedad u otra característica patogénica o patológica subyacente de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), donde el marcador comprende uno o más productos génicos que codifican las proteínas de fusión ALL1, y en el que la asociación entre las proteínas de fusión ALL1 y la expresión de EphA7 es estadísticamente muy significativa.

Se puede evaluar un nivel de expresión del marcador para evaluar una o más rutas metabólicas detectando la presencia de un polinucleótido transcrito o una de sus partes, en el que el polinucleótido transcrito comprende una región de codificación del marcador.

Se describe también en el presente documento una composición que comprende uno o más de los marcadores que se describen en el presente documento.

5 Se describe también en el presente documento un reactivo para someter a ensayo una enfermedad relacionada con cáncer, donde el reactivo comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de al menos un marcador de la reivindicación 7, o una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos del marcador. Como alternativa, el reactivo puede comprender un anticuerpo que reconoce una proteína codificada por al menos un marcador que se describe en el presente documento.

10 Se describe también en el presente documento un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para prevenir, diagnosticar y/o tratar la leucemia linfoblástica aguda (LLA) que comprende: (1) someter un animal a tratamiento cuya eficacia se está evaluando, y (2) determinar el nivel de eficacia del tratamiento que se está ensayando para tratar o prevenir la leucemia linfoblástica aguda (LLA) evaluando al menos un marcador que se describe en el presente documento.

15 El agente terapéutico candidato puede comprender una o más composiciones farmacéuticas, composiciones nutracéuticas, y composiciones homeopáticas. El tratamiento que se está evaluando puede ser para su uso en un sujeto humano.

20 Se describe también en el presente documento una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer producido por leucemia linfoblástica aguda (LLA), que comprende al menos un compuesto inhibidor de la expresión de la proteína de fusión ALL1/Af4, y un transportador farmacéuticamente aceptable. El al menos un compuesto inhibidor de la expresión puede ser específico de un producto génico que está regulado en exceso o en defecto en las células cancerosas con respecto a las células control adecuadas.

25 Se describe también en el presente documento un artículo de fabricación que comprende: al menos un reactivo de captura que se une a un marcador de una enfermedad relacionada con cáncer seleccionado entre al menos uno de los marcadores que se describen en el presente documento.

30 Se describe también en el presente documento un kit para cribar un compuesto candidato para un agente terapéutico para tratar un trastorno relacionado con cáncer, en el que el kit comprende: uno o más reactivos de al menos un marcador que se describe en el presente documento, y una célula que expresa al menos un marcador. La presencia del marcador puede detectarse utilizando un reactivo que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente con al menos un marcador.

35 Se describe también en el presente documento un ensayo de cribado para la leucemia linfoblástica aguda (LLA) que comprende: poner en contacto uno o más de los marcadores que se describen en el presente documento con un sustrato de dicho marcador y con un agente de ensayo, y determinar si el agente de ensayo modula la actividad del marcador. Todas las etapas del método pueden llevarse a cabo *in vitro*.

40 Se describe también en el presente documento un método para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en un individuo que lo necesita, que comprende: administrar al individuo un agente que interfiere con la ruta de señalización de la respuesta de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), en una cantidad suficiente para interferir con dicha señalización, donde el agente comprende al menos un producto génico que interfiere con la fosforilación (Erk) y el crecimiento de células que producen la proteína de fusión ALL/Af4.

45 En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un agente que comprende al menos 5-yodotubercidina (5-ITU) para su uso en el tratamiento de la leucemia en el que las células leucémicas tienen la translocación t(4;11).

50 Se describe también en el presente documento un agente que interfiere con la ruta de señalización de la respuesta de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de la leucemia linfoblástica (LLA) aguda en un individuo, y el agente puede comprender al menos 5-yodotubercidina (5-ITU).

55 Se describe también en el presente documento un método para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de una complicación de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo un agente que interfiere con una cascada de respuesta de la enfermedad de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), y el agente puede comprender 5-yodotubercidina (5-ITU).

60 Se describe también el uso de un agente que interfiere con al menos la cascada de respuestas de la enfermedad de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir, invertir o limitar la gravedad de la complicación de la enfermedad relacionada con el cáncer en un individuo, y el agente puede comprender 5-yodotubercidina (5-ITU).

65 Varios objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada, cuando se lean junto a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de la(s) figura(s)

Figuras 1A y 1B: detección de transcritos de EphA/efrina-A en células K562 transfectadas con construcciones de fusión de ALL1 y en líneas de células leucémicas con la anomalía t(4:11).

5
Figura 1A: Las células K562 transfectadas con construcciones ALL1/AF4 o ALL1/AF9, líneas de células leucémicas pro-B t(4;11) SEMK2 y RS4;11, y la línea pro-B 380 y la línea preB 697 que carecen de anomalías de ALL1 se sometieron a análisis de RT-PCR semicuantitativo para determinar el nivel de expresión de la efrina-A y/o EphA. "Vacío" indica transfección con el vector. La detección de la transferencia Western de las proteínas de fusión All1 recombinantes con mAb dirigido contra HA en transfectantes K562 se muestra en la parte inferior, izquierda.

15
Figura 1B: Se cuantificaron las cantidades del transcrito EphA7 en las células anteriormente mencionadas aplicando la metodología de la RT-PCR en tiempo real. Se determinaron en primer lugar los ADNc sintetizados procedentes de las diversas fuentes celulares para determinar sus valores umbral del ciclo (Uc) para GAPDH. Este procedimiento proporcionó valores de 15,01 + 0,11 (promedio + SD), lo que indican cantidades similares de ADNc total. Los valores Uc determinados para EphA7 se convirtieron a fentogramos (fg), de acuerdo con una curva patrón establecida utilizando una cantidad conocida de ADNc de EphA7 (B, izquierda).

20
Figuras 2A y 3B. La supresión de All1/Af4 en células SEMK2 regula por defecto la expresión de EphA7. Las células SEMK2 transfectadas con ARNip tanto específico de la unión (SEMj) o ARNip control (MVj) se sometieron al análisis de la transferencia Western para la detección de las proteínas p300 All1 (All1), All1/Af4 y Af4 (Figura 2A) y a análisis por RT-PCR semicuantitativa para la detección de los transcritos EphA7 y HoxA9 (Figura 2B). En A, se usó una mezcla de Abs dirigidos contra el extremo N de All1 y Abs dirigidos contra el extremo C de Af4 como sonda.

30
Figuras 3A-3C: Análisis ChIP de la ocupación de las proteínas de fusión All1 en regiones genómicas de EphA7. Figura 3A: Se muestran las regiones genómicas del gen EphA7, designadas n.º 1, 2 y 3, y utilizadas para el análisis ChIP. Figura 3B: el ADN enriquecido en ChIP (utilizando mAb dirigido contra HA) se amplificó mediante la PCR y se resolvió en un gel de agarosa al 2 %. La construcción EGFP en el vector pMACS 4.1 se utilizó como control de la transfección. mIgG indica IgG de ratón normal utilizada como control.

35
Figura 3C: el ADN enriquecido en ChIP se sometió también al análisis de la PCR en tiempo real. El valor umbral del ciclo determinado utilizando el 0,05 % de la entrada total se ajustó al 100 %, y los valores determinados en el ensayo utilizando ADN enriquecido en ChIP se convirtieron a un porcentaje de la entrada. Las barras verticales de cada columna indican la desviación estándar determinada en ensayos por triplicado.

Figuras 4A-4B: EphA7 media la fosforilación de Erk:

40
Figura 4A: Las células K562 y KG1 transfectadas con la construcción EphA7 se analizaron mediante transferencia Western para determinar el estado de fosforilación de c-Raf, Mek1/2 y Erk, así como la detección de la construcción derivada de la proteína EphA7. p-actina sirve como carga control.

45
Figura 4B: se determinó el estado de fosforilación de Erk en células K562 transfectadas con la construcción de fusión ALL1.

50
Figuras 4C-4D: Las células SEMK2, con supresión o de la expresión de EphA7 mediante tratamiento con ARNip específicos de EphA7 (EphA7ip n.º 1 y n.º 2 en la Figura 4C, o mediante tratamiento con ARNip específico de ALL1/AF4 (Figura 4D), se analizaron para determinar el estado de fosforilación de Erk. Se determinó la eficacia de EphA7ip n.º 1 y n.º 2 para la supresión de EphA7 mediante RT-PCR semicuantitativa (Figura 4C, parte inferior).

55
Figuras 5A-5C: 5-yodotubercidina inhibe específicamente la fosforilación de Erk y el crecimiento de las células productoras de la proteína de fusión All1/Af4. Las células SEMK2 con la t(4;11) tratadas durante 24 h bien con disolvente (DMSO) o bien con 5-yodotubercidina (5-ITU) 5 µM se sometieron a un análisis de transferencia Western para detectar la Erk fosforilada. Las líneas de células leucémicas SEMK2 y RS4;11 proB con la t(4;11), y la línea pro-B 380 y la línea pre-B que carece de la anomalía ALL1 se trataron con 5-ITU 1 µM durante 24, 48 y 72 h (parte superior, parte intermedia y parte inferior, respectivamente). En cada punto temporal, las células se sometieron al ensayo MTT (izquierda), al ensayo de actividad de las caspasa 3 (parte intermedia) y al análisis FACS (parte derecha). Los resultados de los ensayos de actividad de MTT y la caspasa 3 se calcularon en forma de un cociente con respecto al valor de las células tratadas con DMSO. Las barras verticales de cada columna indican la desviación estándar determinada en ensayos por triplicado.

60

Descripción detallada

A lo largo de esta divulgación, diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas se referencian mediante una cita identificadora. Las divulgaciones de estas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas se incluyen para describir de forma más completa el estado de la técnica al cual esta invención pertenece.

El inventor del presente documento ha descubierto una correlación entre la expresión de los receptores EphA y los ligandos en las leucemias asociadas a ALL1. En particular, se describe ahora en el presente documento el descubrimiento de una correlación entre la expresión de los receptores EphA y los ligandos en las leucemias asociadas a ALL-1.

El receptor Eph de las tirosina quinasas y sus ligandos asociados a la superficie celular, las efrinas, funcionan como un único sistema de señalización estimulado por la interacción entre células, y han mostrado mediar los procesos de neurodesarrollo. Además, recientes estudios han mostrado la desregulación de algunos genes Eph/efrina en neoplasias malignas, sugiriendo la implicación de esta ruta de señalización en la tumorigénesis.

Los receptores de la secuencia amplificada del hepatoma productores de eritropoyetina (Eph) son una amplia de receptores de las tirosina quinasas que comprenden los receptores 8 EphA y 6 EphB en seres humanos. La distinción entre los receptores EphA y B se basa en la similitud dentro de cada grupo de secuencias del dominio extracelular y en su afinidad por los ligandos efrina-A y efrina-B. De esta manera, los receptores EphA se unen a los ligandos, denominados efrina-A1, -A2, -A3, -A4 y -A5 anclados sobre la membrana celular mediante glicosilfosfatidilinositol, mientras que los receptores EphB se unen a los ligandos denominados efrina-B1, -B2 y -B3, que son moléculas transmembrana. Como tanto los receptores Eph como las efrinas se ubican en la superficie celular, la señalización se restringe a los sitios de contacto directo entre células, y puede inducir acontecimientos bidireccionales recíprocos entre las células interactuantes. Esta característica única ha mostrado jugar un papel crítico en el establecimiento de conexiones neuronales organizadas topológicamente en muchas regiones del sistema nervioso en desarrollo. Recientes estudios han dado a conocer además la implicación de la interacción Eph-efrina en varios procesos de desarrollo que incluyen la diferenciación arteriovenosa, la migración celular que da como resultado la compartimentación de subpoblaciones celulares en el tejido en desarrollo y el movimiento de células en el ambiente embrionario adecuado que puede determinar un destino celular concreto y dar como resultado una diferenciación y modelización celular (revisado en la ref. 1). Además de dichos papeles fisiológicos, recientes estudios han revelado la desregulación de algunos de los genes Eph/efrina en las neoplasias malignas. Entre estos se incluye la regulación en exceso de la efrina-A1 o B2 en melanoma (2, 3), la regulación en exceso de EphB2 en el cáncer de estómago (4) y en el cáncer de mama (5), la regulación en exceso de EphA2 en cánceres de próstata (6), mama (7) y de esófago (8), algunos de los cuales se han mostrado asociados con invasión tumoral o metástasis tumoral y por tanto asociados con un pronóstico malo.

Por el contrario, se detectó la inactivación de EphB2 en cánceres de próstata (9) y colon (10), sugiriendo una función supresora tumoral de este receptor Eph en tumores relevantes. A diferencia de los tumores sólidos, se sabe menos del papel de la ruta Eph/efrina en el desarrollo de neoplasias hematológicas.

Aunque EphA7 se expresa en células pro-B y pre-B de médula ósea de feto, está silenciado en la serie completa de células de linaje B de adulto (13). Hasta ahora, no existía correlación entre la expresión de receptores EphA y los ligandos en leucemias asociadas a ALL-1.

El inventor en el presente documento demuestra ahora que la regulación en exceso de EphA7 está acompañada por la fosforilación de Erk. Asimismo, la muerte celular apoptótica, específica de células leucémicas que llevan la translocación en el cromosoma t(4;11), tras el tratamiento de las células con un bloqueante de la fosforilación de Erk.

En un amplio aspecto, el inventor del presente documento ha investigado la expresión de los receptores EphA en células productoras de las proteínas de fusión All1/Af4 y All1/Af9, y ha descubierto que ambas proteínas inducían la transcripción de EphA7.

Los análisis de inmunoprecipitación de la cromatina han demostrado la ocupación de las proteínas de fusión del promotor EphA7, indicando EphA7 como diana directa de las proteínas de fusión All1. Consistente con dichos resultados, se demostró la expresión de EphA7 dependiente de All1/Af4 en una línea de células pro-B con la t(4;11).

Adicionalmente, La disminución de la expresión de EphA7 directa o la supresión de EphA7 mediada por la disminución de la expresión de All1/Af4 en las células leucémicas t(4;11) da como resultado una atenuación de la fosforilación de Erk1/2.

Además, el tratamiento de células leucémicas que transportan la t(4;11) con un inhibidor de la fosforilación de Erk indujo la muerte celular apoptótica.

Estos resultados indican que las proteínas de fusión All1 regulan directamente en exceso la expresión de EphA7, que aparentemente da como resultado la fosforilación de Erk. Es probable que la última modificación contribuya al mantenimiento del fenotipo maligno.

5 Ejemplos

El cribado de células K562 productoras de la proteína de fusión All1/Af4 o All1/Af9 recombinante reveló la regulación en exceso de la transcripción del EphA7. Consistente con este hallazgo, la supresión de All1/Af4 en células SEMK2 que transportan la translocación en el cromosoma t(4;11) mediada por el ARNip dio como resultado la regulación por defecto de EphA7. El análisis de inmunoprecipitación de la cromatina ha demostrado la ocupación de las proteínas de fusión All1 etiquetadas en el promotor EphA7, apuntando a EphA7 como diana directa del anterior.

Resultados

15 Las proteínas de fusión All1 inducen la expresión del receptor EphA7.

Aplicando una estrategia de transfección para expresar ectópicamente All1/Af4 y All1/Af9 en células K562 (Fig. 1A, parte inferior, izquierda), se determinó el nivel de expresión de los genes que codifican los receptores 8 EphA y 5 ligandos efrina-A en los transfectantes. El análisis de la RT-PCR semicuantitativa mostró que ambas proteínas de fusión All1 inducen la transcripción de todos los genes del receptor EphA, aunque no ejercen un efecto notable sobre la inducción de los genes de efrina A (Fig. 1A).

Para extender adicionalmente este hallazgo a células leucémicas con redistribución de ALL1, las líneas de células SEMK2 y proB RS4;11 que tenían la translocación t(4;11), y las líneas de células proB 380 y pre-B 697 que carecen de anomalías de ALL1 se sometieron a análisis similares (Fig. 1B).

Este análisis mostró una expresión consistente y diferencial de EphA7 en las líneas leucémicas t(4;11). La posterior cuantificación del transcrito EphA7 mediante la aplicación de la metodología de RT-PCR en tiempo real permitió la estimación de las cantidades del transcrito en células K562 transfectadas con ALL1/AF4 o ALL1/AF9, en células SEMK2 y en células RS4;11, que fue de 0,04 + 0,01, 0,014 + 0,006, 1,97 + 0,6, y 0,68 + 0,09 (promedio + SD fentogramo), respectivamente.

En paralelo, se determinó que la cantidad de ARN de EphA7 en el vector transfectado K562, en células 380 y 697 intactas era menor de 0,001 fg (Fig. 1C).

Estos resultados apuntan en su conjunto a que EphA7 es una diana consistentemente sensible de las proteínas de fusión All1, y da lugar a análisis adicionales de su regulación en exceso. Para discernir que la proteína de fusión All1 endógena producida en células leucémicas que transporta una anomalía de ALL1 regula la transcripción de EphA7, los inventores suprimieron All1/Af4 producido en células SEMK2 aplicando la metodología del ARN interferente pequeño (ARNip). El ARNip SEMj generado por el inventor del presente documento (14) y otros (15) se diseñó para dirigirse a la unión de la fusión ALL1/AF4 específica de células SEMK2; en paralelo, el ARNip MVj se dirige a la unión de la fusión producida en otras células (MV4;11), y sirvió de esta manera como control negativo. Los inventores determinaron en primer lugar la eficacia del ARNip SEMj en la supresión de la proteína All1/Af4 y encontraron aprox. una reducción del 80 % de esta última, sin efecto sobre el nivel de expresión de All1 o Af4 normal (Fig. 2A).

Las células SEMK2 tratadas con el ARNip SEMj se sometieron a continuación al análisis semicuantitativo de RT-PCR para determinar el nivel de expresión de EphA7 así como de HoxA9; este último es una diana conocida de las proteínas de fusión All1 (16) y sirvió de esta manera como control positivo para discernir el efecto de la eliminación de la proteína de fusión All1. Este análisis demostró que la supresión de All1/Af4 en células SEMK2 atenúa la expresión de EphA7 y HoxA9, respaldando la idea de que la proteína de fusión All1 media en la regulación de la transcripción de EphA7 (Fig. 2B).

55 Las proteínas de fusión All1 se unen al locus genómico de EphA7.

Aplicando la metodología de inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP), los inventores determinaron la ocupación de All1/Af4 y All1/Af9 etiquetados con HA de forma exógena expresados en células K562. Las regiones genómicas de EphA7 analizadas mediante cartografía con ChiP en aproximadamente unos 0,7 kb en la dirección 3' y 0,6 kb en la dirección 5' desde el sitio de inicio de la transcripción, y en la secuencia no codificante 3'; se denominaron región n.º 1, n.º 2 y n.º 3, respectivamente (Fig. 3A).

Este análisis mostró la unión de las proteínas quiméricas All1/Af4 y All1/Af9 a la región n.º 1 y n.º 2, pero no a la región n.º 3 (Fig. 3B).

65 El análisis cuantitativo de la PCR en tiempo real respaldó los resultados anteriores (Fig. 3C), lo que indica que EphA7 es una diana directa de las proteínas de fusión All1.

EphA7 es un mediador esencial en la inducción de la fosforilación de Erk.

- Se sabe poco acerca de la(s) ruta(s) de transducción de la señal en las que está implicado EphA7. En primer lugar, los inventores examinaron el estado de fosforilación de algunas proteínas comúnmente asociadas con las rutas de transducción de la señalización de RTK en células K562 transfectadas con una construcción EphA7 de longitud completa. Consistente con los resultados anteriores (véase la Fig. 1A, derecha), la proteína EphA7 no se observó en células K562 intactas, pero se detectó de manera dependiente de la dosis en células transfectadas con la construcción EphA7 (Fig. 4A, izquierda).
- Los inventores no encontraron inducción evidente de la fosforilación de c-Raf o Mek1/2, dos proteínas que se fosforilan en respuesta a la activación de la ruta de transducción de Ras (Fig. 4A, izquierda).
- Por el contrario, los inventores descubrieron que la expresión en exceso de EphA7 está correlacionada con la fosforilación de Erk. Esto se determinó mediante el sondeo secuencial de una transferencia Western con Ab dirigido contra Erk y posteriormente con un anticuerpo contra Erk fosforilada que detecta específicamente p-Erk (Fig. 4A, izquierda).
- Se había mostrado anteriormente que las Mek1/2 están muy fosforiladas en células K562 intactas (17). Dicha fosforilación de Mek1/2 intensa básica puede haber ocultado un cambio adicional en la fosforilación inducida por la expresión en exceso de EphA7. Por tanto, los inventores expresaron ectópicamente EphA7 en la línea de células KG1 de AML. Aquí, los inventores encontraron la inducción de la fosforilación de Mek1/2, tras la expresión de EphA7 recombinante (Fig. 4A, derecha).
- Los inventores observaron también que la fosforilación de Mek1/2 en células KG1 estaba acompañada por la fosforilación de Erk2 así como por la fosforilación de Erk1 (Fig. 4A, derecha).
- Como la función principal de Mek es fosforilar Erk (18), los resultados de los inventores indican que EphA7 se sitúa anteriormente a esta cascada.
- Los inventores determinaron a continuación si las proteínas de fusión All1 inducen la fosforilación de Erk como hace EphA7. De hecho, se observó la inducción de la fosforilación de Erk en células K562 transfectadas con las construcciones ALL1/AF4 y ALL1/AF9 (Fig. 4B).
- Para valorar que EphA7 es un mediador esencial para la fosforilación de Erk en estos transfectantes, se trataron células SEMK2 con ARNip dirigidos contra el ARNm de EphA7 en dos regiones diferentes del transcrito (EphA7ip n.º 1 y n.º 2 en la Fig. 4C).
- Se ha mostrado que ambos ARNip regulan por defecto el ARNm con una eficacia de -70 % (Fig. 4C, parte inferior). La supresión de EphA7 dio como resultado una fuerte reducción de la fosforilación de Erk1 y Erk2, que no tiene efecto sobre la cantidad del Erk total (Fig. 4C, parte superior).
- Esto implica que EphA7 es un mediador esencial para la fosforilación de Erk1/2 en células que expresan las fusiones de All1. Adicionalmente, los inventores han descubierto que la disminución en la expresión de All1/AF4 en células SEMK2 produjo de manera similar una fosforilación reducida de Erk1/2 (Fig. 4D).
- Un inhibidor de la fosforilación de ERK2, 5-yodotubercidina, induce muerte celular en las líneas de células leucémicas con la anomalía t(4;11).
- Los inventores examinaron el efecto de la 5-yodotubercidina (5-ITU), un inhibidor de la fosforilación de Erk (19), sobre la proliferación celular. Para discernir el efecto bioquímico de 5-ITU, células SEMK2 con la t(4;11) que producían Erk1/2 fosforilada (véanse los campos "-" y "control ip" en la Fig. 4C y D) se trataron con este compuesto y se determinó el estado de la fosforilación de EWrk mediante el análisis de la transferencia Western (Fig. 5, parte superior, derecha).
- El resultado indicó la inhibición de la fosforilación de Erk por 5-ITU. La aplicación del ensayo MTT indicó la reducción en los números de células SEMK2 y RS4;11 con t(4;11), sin disminución en el número de células 380 y 697 del control (Fig. 5, izquierda). Los inventores han descubierto que la disminución de la expresión de All1/AF4 en células SEMK2, que produjo la inactivación de Erk1/2 (véase la Fig. 4D), dio como resultado una reducción aprox. del 25 % en el número de células en comparación con el número de células tratadas con el ARNip del control (H. Nakanishi, resultado sin publicar). Para determinar la causa de la reducción en el número de células, las células tratadas con 5-ITU se sometieron a ensayos que determinaban la muerte celular apoptótica (ensayo de actividad de la caspasa 3 y análisis FACS). Se demostró un aumento de actividad de la caspasa 3 a las 24 h en células leucémicas sensibles a 5-ITU (SEMK2 y RS4;11 en la Fig. 5B). En paralelo, una elevada proporción de estas células se distribuyó en la fase subG1 (Fig. 5C). Estos resultados han demostrado la dependencia de las células leucémicas produciendo la proteína de fusión All1/AF4 sobre la fosforilación de Erk, previniendo esto último la muerte celular apoptótica.

Discusión

En el presente estudio, los inventores han mostrado que la expresión ectópica en células K562 de las proteínas de fusión All1 leucemogénicas All1/Af4 y All1/Af9 indujo la transcripción de algunas RTK de EphA tras una corta latencia (16 h después de la transfección). De forma significativa, la aplicación de dicha solución para inducir HoxA9 no funciona. De esta manera, los inventores han descubierto que la expresión ectópica de All1/Af4 o All1/Af9 no induce la expresión de HoxA9, y que era necesario el tratamiento adicional de los transfectantes con el inhibidor de la tricostatina A HDAC (T. Nakamura, datos no publicados). Por tanto, parece que capa(s) adicional(es) de la regulación de la transcripción está(n) implicada(s) en la inducción de HoxA9 por las proteínas de fusión All1. Los inventores señalan que no se ha mencionado la desregulación de EphA7 en estudios previos del perfil de expresión del gen en leucemias agudas asociadas a ALL1 (20, 21).

Una revisión reciente que se refiere a receptores Eph y la señalización de efrina (ref. 1) ha mostrado la implicación de una amplia variedad de rutas, incluyendo ejemplos de activación o inhibición de varias rutas de señalización diferentes por un único receptor Eph. En la actualidad, sin embargo, no se han determinado las rutas de señalización implicadas en EphA7 RTK. En este estudio, los inventores han examinado el estado de la fosforilación de los componentes principales de la ruta MAPK/Erk que incluyen c-Raf, Mek1/2 y Erk en células K562 que expresan cualquiera de las dos proteínas de fusión All1 exógenas o EphA7. Las tres proteínas indujeron la fosforilación de Erk. Los inventores notificaron también la fosforilación de Erk en una transfección control con la construcción EGFP, aunque la extensión de la fosforilación inducida por esta última es menor de 1/5 de la inducida por las proteínas de fusión All1 (véase la Fig. 4B).

Adicionalmente, el ARNip medió la supresión dirigida contra All1/Af4 o EphA7 en células SEMK2, lo que da como resultado una notable reducción de la fosforilación de Erk (véanse las Figs. 4C y 4D). Estos resultados indican que EphA7 media a su vez la fosforilación de Erk en los transfectantes K562 y en las células SEMK2. No se observó inducción de la fosforilación de c-Raf y Mek1/2 por EphA7 en células K562 (véase la Fig. 4A). Sin embargo, un estudio adicional con células KG1 mostró la fosforilación de Mek1/2 mediada por EphA7, acompañada con la inducción de la fosforilación de Erk1/2. Es por tanto probable que EphA7 active Mek1/2, llevando a la fosforilación de Erk. Sin embargo, los inventores no pueden excluir la posibilidad de que la fosforilación de Erk mediada por EphA7 en K562 se ejecute por una ruta diferente de la MAPK/Erk clásica. Con respecto a este problema, dos estudios sugieren la presencia de rutas independientes de MEK (22, 23).

Debido a la ausencia de anticuerpos para la detección específica de EphA7 fosforilada, los inventores no pudieron determinar si la EphA7 inducida por la proteína de fusión All1 ectópica o la EphA7 recombinante en K562 y EphA7 endógena en células SEMK2 están presentes en una forma fosforilada activa. Un estudio de un ensayo de unión *in vitro* efrina-A ligando-receptor mostró previamente que EphA7 presenta una elevada afinidad por los ligandos efrina-A3 y efrina-A5 (24).

En el presente estudio, los inventores han descubierto un nivel estacionario de expresión de la efrina-A3 en células K562 transfectadas tanto con el vector vacío del control como con la construcción de fusión All1 (véase la Fig. 1).

Es por tanto probable que EphA7 expresada en células K562 interactúe con el ligando efrina-A3 producido en las mismas células y que afectando la activación de la ruta Eph/efrina. Adicionalmente, la fosforilación de Erk producida mediante la expresión en exceso de EphA7 en células K562, y la reducción en la fosforilación de Erk1/2 producida por la supresión de EphA7 en células SEMK2, sugiere que la proteína EphA7 es activa en cualquier circunstancia.

La expresión de los receptores Eph incluyendo EphA7 está estrechamente regulada. Un estudio previo para determinar la expresión de EphA7/Hek11 en células hematopoyéticas humanas mostró la expresión regulada del gen en células pro y pre-B de médula ósea de feto, pero no en células de médula ósea de adulto de las mismas etapas diferenciales (13). Consistente con estos resultados, los inventores han descubierto también que el nivel de expresión de EphA7 en las líneas de células prob 380 y pre-B 697 así como en células K562 intactas estaba por debajo del límite de detección (0,001 fg >) como se ha evaluado mediante la metodología de la RT-PCR en tiempo real. La detección de EphA7 en las líneas de células pro-B SEMK2 y RS4;11 argumentaría además que All1/Af4 regula en exceso la expresión de EphA7 en células pro-B.

Los inventores han descubierto que 5-ITU suprimió el crecimiento de las células leucémicas productoras de la proteína de fusión All1/Af4 induciendo la apoptosis. 5-ITU fue descubierto originalmente como un potente inhibidor de la adenosina quinasa (Ki = 30 nM), las quinasas específicas de Ser/Thr tales como las caseína quinasas 1 y 2, y el fragmento de quinasa del receptor de la insulina. Se estimó que la Ki de la inhibición de la fosforilación de ERK2 era 525 nM (19). Es por tanto posible que el tratamiento de las células con 5-ITU 1 µM no produjera solamente la inactivación de Erk sino que también afectara las quinasas anteriormente mencionadas. Con respecto a esto, el efecto apoptótico diferencial en las dos líneas de células t(4;11) era evidente.

Materiales y métodos

Los métodos que incluyen la expresión de la proteína recombinante en células K562 y en células KG1, la interferencia del ARN, análisis por transferencia de Western, y el ensayo MTT, el ensayo de actividad de la caspasa 3 y el análisis FACS están disponibles en la Información complementaria que se encuentra en Internet.

Líneas celulares

La línea de células K562 de la eritroleucemia humana, la línea de células KG1 de AML y la línea de células pro-B RS4;11 de LLA con la anomalía t(4;11) se obtuvieron de la ATCC. El Dr. Johann Greil proporcionó la línea SEMK2. Otras líneas de células de LLA seleccionadas para este estudio (380, 697) se mantuvieron en el laboratorio de los inventores. Todas las líneas de células se hicieron crecer en medio RPMI1640 suplementado con suero de feto de ternera al 10 %.

15 Análisis de la RT-PCR semicuantitativa y en tiempo real

Se aisló el ARN total a partir del transfectante 16 h después de la transfección utilizando los kits de columna giratoria RNeasy de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). 5 µg de ARN se sometieron a la síntesis del ADNc utilizando el SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA). Al final de la reacción, se añadieron 40 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) y se usó 1 µl de la reacción (1/60 de volumen) como molde de la PCR. Los siguientes números de ciclos, que permitieron la comparación semicuantitativa, se aplicaron a la PCR: 35 ciclos de RphA1, 2, 4, 7, 8 y efrina-A1, 2, 3, 4, 5; 40 ciclos de EphA3, 5, 6; 25 ciclos de GAPDH; 32 ciclos de HoxA9.

25 Se cuantificó el transcrito de EphA7 utilizando el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN) para la amplificación del ADNc (1 µl de ADNc de una reacción de 60 µl, que corresponde a 0,083 µg de ARN) y un sistema de detección de la PCR en tiempo real iCycler (BioRad) para la detección del producto de la PCR. Se determinaron los valores umbral del ciclo (Uc) utilizando cantidades conocidas de ADNc de EphA7 (diluciones en serie 10 veces comenzando a 100 pg) para la curva patrón. El valor Uc del ADNc sometido a ensayo se convirtió a peso de acuerdo con la curva patrón.

Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

35 Se llevó a cabo el ensayo ChIP de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). 16 h después de la transfección con las construcciones de fusión ALL1, se reticularon 5×10^6 células (transfectantes K562), se lavaron con PBS, se volvieron a suspender en 1 ml de tampón de lisis SDS y sometieron a sonicación para generar aprox. 200-1000 pb de fragmentos de ADN. 1/10 volumen de esta preparación, es decir, una alícuota de 0,1 ml que contenía 25 µg de ADN, se usó en cada ChIP. Los anticuerpos utilizados fueron el clon F-7 del mAb dirigido contra HA, y la IgG normal de ratón adquirida de Santa Cruz Biotech. La cromatina inmunoprecipitada se desreticuló, se desproteinizó y se volvió a suspender en 50 µl de TE, pH 8,0, y se usó una alícuota de 1 µl de esta preparación como molde de la PCR. La entrada indica la reacción de la PCR utilizando un 0,05 % de la entrada total de cromatina, que corresponde a 0,0125 µg de ADN. Las secuencias del cebador EphA7 en el ensayo ChIP son:

45 región n.º 1 5'-ATGCAGCGAAATGGAAAAC-T-S' (directo) y 5'-AAAAGGGAGTGGGAAAGGAA-3' (inverso)

región n.º 2 5'-TAGTACCTCAGGCGGGTCAC-S' (directo) y 5'-TTCCGAGCTCATCGAAGTCT-3' (inverso)

región n.º 3 5'-TTGTCGTTGGACGTTTACAT-S' (directo) y 5'-CAATAGCGCCTCATCTGACA-3' (inverso).

50 El ADN enriquecido en ChIP se sometió también al análisis de la PCR en tiempo real esencialmente como se describe en la sección "Análisis RT-PCR semicuantitativo y en tiempo real". Los resultados se calcularon como % de entrada de acuerdo con la siguiente fórmula: $100/2^{Ct}$ de ADN enriquecido con ChIP Uc de ADN de entrada (%).

Ejemplos de usos

55 En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para predecir la supervivencia de un sujeto con cáncer. El método de predicción se basa en la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores en células cancerosas. Se ha descubierto que algunos biomarcadores tienden a expresarse en exceso en supervivientes de cáncer a corto plazo, mientras que otros biomarcadores tienden a expresarse en exceso en supervivientes de cáncer a largo plazo. El modelo de expresión único de estos biomarcadores en una muestra de células procedentes de un sujeto con cáncer se puede usar para predecir el tiempo de supervivencia relativo, y en última instancia el pronóstico, para este sujeto.

Un método para predecir la supervivencia de un sujeto con cáncer

Un aspecto de la divulgación proporciona un método para predecir la supervivencia de un sujeto con cáncer. El método comprende determinar la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores en una muestra de células procedente de un sujeto con cáncer. Se puede usar la firma de expresión del biomarcador del cáncer para derivar una puntuación de riesgo que es predictiva de la supervivencia de este cáncer. La puntuación puede indicar riesgo bajo, de tal manera que el sujeto puede sobrevivir largo tiempo (es decir, más de 5 años), o la puntuación puede indicar riesgo alto, de tal manera que el sujeto no puede sobrevivir largo tiempo (es decir, menos de dos años).

Biomarcadores relacionados con la supervivencia

Algunos de los biomarcadores se expresan en exceso en supervivientes a largo plazo y algunos de los biomarcadores se expresan en exceso en supervivientes a corto plazo. Un biomarcador puede jugar un papel en la metástasis del cáncer afectando la adhesión celular, la motilidad celular, o la inflamación y las respuestas inmunes. Un biomarcador también puede estar implicado en la apoptosis. Un biomarcador puede jugar un papel en el mecanismo de transporte. Un biomarcador también puede estar asociado con la supervivencia en otros tipos de cánceres.

Medida de la expresión de una pluralidad de biomarcadores

La medida incluye medir la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores relacionados con la supervivencia en una muestra de células de un sujeto con cáncer. El modelo diferencial de expresión en cada cáncer o firma de expresión génica puede utilizarse a continuación para generar una puntuación de riesgo que es predictiva de la supervivencia del cáncer. Puede aumentarse o disminuirse el nivel de expresión de un biomarcador en un sujeto con respecto a otros sujetos con cáncer. La expresión de un biomarcador puede ser mayor en supervivientes a largo plazo que en supervivientes a corto plazo. Como alternativa, la expresión de un biomarcador puede ser mayor en supervivientes a corto plazo que en supervivientes a largo plazo.

La expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores puede medirse mediante varias técnicas que son bien conocidas en la materia. La cuantificación de los niveles del ARN mensajero (ARNm) de un biomarcador puede utilizarse para medir la expresión del biomarcador. Como alternativa, la cuantificación de los niveles del producto de proteína de un biomarcador puede servir para medir la expresión del biomarcador. Se puede encontrar información adicional con respecto a los métodos descritos a continuación en Ausubel *et al.*, (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, o en Sambrook *et al.* (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Un experto en la materia sabrá qué parámetros pueden manipularse para optimizar la detección del ARNm o la proteína de interés.

Se puede usar una micromatriz de ácido nucleico para cuantificar la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores. Se puede llevar a cabo el análisis de la micromatriz utilizando equipo comercialmente disponible, siguiendo los protocolos del fabricante, tal como mediante el uso de la tecnología Affymetrix GeneChip® (Santa Clara, CA) o el Microarray System de Incyte (Fremont, CA). Normalmente, los ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc u oligonucleótidos) se siembran, o se distribuyen en forma de matriz, sobre un sustrato de microchip. Las secuencias distribuidas en forma de matriz se hibridan a continuación con sondas específicas de ácidos nucleicos procedentes de las células de interés. Se pueden generar sondas de ADNc marcadas fluorescentemente mediante la incorporación de desoxinucleótidos marcados de forma fluorescente mediante la transcripción inversa del ARN extraído de las células de interés. Como alternativa, el ARN puede amplificarse mediante transcripción *in vitro* y marcarse con un marcador, tal como biotina. A continuación, las sondas marcadas se hibridan con los ácidos nucleicos inmovilizados sobre el microchip en condiciones muy rigurosas. Tras el lavado riguroso para eliminar las sondas unidas de forma no específica, se realiza un barrido del chip mediante microscopio de láser confocal u otro método de detección, tal como una cámara CCD. Los datos brutos de intensidad de la fluorescencia de los archivos de hibridación se preprocesan de forma general con el algoritmo promedio multichip sólido (RMA, por sus siglas en inglés) para generar valores de expresión.

La PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) se puede usar también para medir la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores. En la QRT-PCR, el molde de ARN se transcribe generalmente de forma inversa en ADNc, que a continuación se amplifica mediante una reacción de la PCR. La cantidad de producto de la PCR se sigue ciclo a ciclo en tiempo real, lo que permite la determinación de las concentraciones iniciales de ARNm. Para medir la cantidad de producto de la PCR, la reacción se puede llevar a cabo en presencia de un colorante fluorescente, tal como Verde SYBR, que se une a un ADN bicatenario. La reacción se puede llevar a cabo también con una sonda indicadora fluorescente que es específica del ADN que se está amplificando. Un ejemplo no limitante de sonda indicadora fluorescente es la sonda TagMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). La sonda indicadora fluorescente fluoresce cuando se elimina el inactivador durante el ciclo de extensión de la PCR. Se puede llevar a cabo la QRT-PCR multiplete utilizando múltiples sondas iniciadoras específicas de genes, cada una de las cuales contiene un fluoróforo diferente. Se registraron los valores de la fluorescencia durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese punto en la reacción de amplificación. Para minimizar los errores y reducir

cualquier variación entre muestras, se llevó a cabo normalmente la QRT-PCR utilizando un patrón de referencia. El patrón de referencia ideal se expresó a un nivel constante entre diferentes tejidos, y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los patrones de referencia adecuados incluyen, pero no se limitan a, los ARNm de los genes constitutivos de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y la beta-actina. El nivel de ARNm en la muestra original o las veces de cambio en la expresión de cada biomarcador puede determinarse usando cálculos bien conocidos en la técnica.

Se puede usar también la tinción inmunohistoquímica para medir la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores. Este método permite la localización de una proteína en las células de una sección de tejido mediante la interacción de la proteína con un anticuerpo específico. Para ello, el tejido se puede fijar en formol u otro fijador adecuado, se incluye en cera o plástico, y se corta en secciones finas (de aproximadamente 0,1 mm a varios mm de espesor) con un micrótopo. Como alternativa, el tejido puede congelarse y cortarse en secciones finas utilizando criostato. Las secciones de tejido pueden disponerse sobre la parte superior y fijarse a una superficie sólida (es decir, una micromatriz de tejido). Las secciones de tejido se incuban con un anticuerpo primario contra el antígeno de interés, seguido por lavados para eliminar los anticuerpos no unidos. El anticuerpo primario puede acoplarse a un sistema de detección, o el anticuerpo primario puede detectarse con un anticuerpo secundario que se acopla a un sistema de detección. El sistema de detección puede ser un fluoróforo o puede ser una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, que puede convertir un sustrato en un producto colorimétrico, fluorescente, o quimioluminiscente. Las secciones de tejido teñidas se someten generalmente a una exploración con microscopio. Como una muestra de tejido procedente de un sujeto puede ser heterogénea, es decir, algunas células pueden ser normales y otras células pueden ser cancerosas, se puede determinar el porcentaje de células teñidas positivamente en el tejido. Esta medida, junto con una cuantificación de la intensidad de la tinción, se puede usar para generar un valor de expresión para el biomarcador.

Se puede usar un ensayo de inmunoadsorción, o ELISA, para medir la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores. Existen muchas variaciones de un ensayo ELISA. Todas se basan en la inmovilización de un antígeno o anticuerpo sobre una superficie sólida, generalmente una placa de microvaloración. El método ELISA original comprende preparar una muestra que contiene las proteínas de interés del biomarcador, revestir los pocillos de una placa de microvaloración con la muestra, incubar cada pocillo con un anticuerpo primario que reconoce un antígeno específico, eliminar por lavado el anticuerpo no unido, y a continuación detectar los complejos anticuerpo-antígeno. Los complejos anticuerpo-antígeno pueden detectarse directamente. Para ello, los anticuerpos primarios se conjugan con un sistema de detección, tal como una enzima que produce un producto detectable. Los complejos anticuerpo-antígeno pueden detectarse indirectamente. Para ello, el anticuerpo primario se detecta mediante un anticuerpo secundario que se conjuga con un sistema de detección, tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, la placa de microvaloración se somete a exploración y los datos brutos de la intensidad se pueden convertir en valores de expresión utilizando medios conocidos en la técnica.

Se puede usar también una micromatriz de anticuerpos para medir la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores. Para ello, una pluralidad de anticuerpos se dispone y se une covalentemente a la superficie de la micromatriz o biochip. Un extracto de proteínas que contiene las proteínas biomarcadoras de interés se marca generalmente con un colorante fluorescente. Las proteínas biomarcadoras marcadas se incuban con la micromatriz de anticuerpos. Tras los lavados para eliminar las proteínas no unidas, la micromatriz se somete a barrido. Los datos brutos de intensidad de la fluorescencia se pueden convertir en valores de expresión utilizando los medios conocidos en la técnica.

Se pueden usar también microesferas multiplexantes Luminex para medir la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores. Estas perlas microscópicas de poliestireno están codificadas por colores internamente con colorantes fluorescentes, de tal manera que cada perla tiene una única firma espectral (de la cual existen hasta 100). Las perlas con la misma firma se etiquetan con un oligonucleótido específico o anticuerpo específico que se unirá a la diana de interés (es decir, el ARNm biomarcador o la proteína, respectivamente). La diana, a su vez, se etiqueta también con un indicador fluorescente. De este modo, existen dos fuentes de color, una procedente de la perla y la otra procedente de la molécula indicadora en la diana. Las perlas se incuban a continuación con la muestra que contiene las dianas, de las que se pueden detectar hasta 100 en un pocillo. El tamaño/área superficial pequeño de las perlas y la exposición tridimensional de las perlas a las dianas permite cinéticas de fase casi en solución durante la reacción de unión. Las dianas capturadas se detectan mediante fluidos de alta tecnología basados en citometría de flujo en los cuales los láseres excitan los colorantes internos que identifican cada perla y también cualquier colorante indicador durante el ensayo. Los datos de los archivos de adquisición se pueden convertir en valores de expresión utilizando medios conocidos en la técnica.

Se puede utilizar también la hibridación in situ para medir la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores. Este método permite la localización de los ARNm de interés en las células de una sección de tejido. Para este método, el tejido puede congelarse, o fijarse e incluirse, y a continuación cortarse en secciones finas, que se disponen y se prefijan sobre una superficie sólida. Las secciones de tejido se incuban con una sonda de sentido contrario marcada que se hibridará con un ARNm de interés. Las etapas de lavado e hibridación se llevan a cabo generalmente en condiciones muy rigurosas. La sonda puede marcarse con un fluoróforo o una etiqueta pequeña (tal como biotina o digoxigenina) que se puede detectar mediante otra proteína o anticuerpo, de tal manera que el

híbrido marcado puede detectarse y visualizarse con un microscopio. Se pueden detectar simultáneamente múltiples ARNm, con la condición de que cada sonda de sentido contrario tenga una marca distinguible. La matriz de tejido hibridada se somete generalmente a una exploración con microscopio. Como una muestra de tejido procedente de un sujeto puede ser heterogénea, es decir, algunas células pueden ser normales y otras células pueden ser cancerosas, se puede determinar el porcentaje de células teñidas positivamente en el tejido. Esta medida, junto con una cuantificación de la intensidad de la tinción, se puede usar para generar un valor de expresión para cada biomarcador.

El número de biomarcadores cuya expresión se mide en una muestra de células procedentes de un sujeto con cáncer puede variar. Como la puntuación prevista de supervivencia se basa en la expresión diferencial de los biomarcadores, debe conseguirse un grado mayor de fiabilidad cuando se mide la expresión de más biomarcadores.

Obtención de una muestra de células procedentes de un sujeto con cáncer

La expresión de una pluralidad de biomarcadores se medirá en una muestra de células procedentes de un sujeto con cáncer. El tipo y la clasificación del cáncer pueden variar y deben variar. El cáncer puede ser un cáncer en etapa temprana, es decir, etapa I o etapa II, o puede ser un cáncer en etapa tardía, es decir, etapa III o etapa IV.

En general, la muestra de células o la muestra de tejido se obtendrá del sujeto con cáncer mediante biopsia o resección quirúrgica. El tipo de biopsia puede y debe variar, dependiendo de la localización y de la naturaleza del cáncer. Una muestra de células, tejido, o fluido puede extraerse mediante biopsia con aspiración a través de aguja. Para ello, una aguja fina unida a una jeringuilla se inserta a través de la piel y en el órgano o tejido de interés. La aguja se dirige normalmente a la región de interés utilizando ultrasonidos o mediante diagnóstico por imágenes mediante tomografía computerizada (TC). Una vez que la aguja se inserta en el tejido, se crea un vacío con la jeringuilla de tal manera que las células o el fluido pueden aspirarse a través de la aguja y recogerse en la jeringuilla. Se puede retirar también una muestra de células o de tejido mediante incisión o biopsia del núcleo. Para ello, un cono, un cilindro, o un poquito de tejido se retira de la región de interés. Se usa generalmente el diagnóstico por imágenes mediante TC, ultrasonidos, o un endoscopio para dirigir este tipo de biopsia. Por último, la lesión cancerosa puede extirparse completamente mediante biopsia con escisión o resección quirúrgica.

Una vez que una muestra de células o muestra de tejido se retira de un sujeto con cáncer, se puede procesar para el aislamiento del ARN o la proteína utilizando técnicas bien conocidas en la materia y que se describen en los libros de referencia de biología molecular normales, tales como Ausubel *et al.*, (2003) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY. Una muestra de tejido puede también almacenarse o congelarse instantáneamente y almacenarse a -80 % para uso posterior. La muestra de tejido sometido a biopsia puede también fijarse con un fijador, tal como formol, para formaldehído, o ácido acético/etanol. La muestra de tejido fijado puede incluirse en cera (parafina) o una resina plástica. La muestra de tejido incluido (o muestra de tejido congelado) puede cortarse en secciones. El ARN o la proteína puede también extraerse a partir de una muestra de tejido fijado o incluido en parafina.

El sujeto con cáncer será generalmente un sujeto mamífero. Los mamíferos pueden incluir primates, animales de ganadería, y animales de compañía. Los ejemplos no limitantes incluyen: los primates que pueden incluir seres humanos, simios, monos, y gibones; Los animales de ganadería pueden incluir caballos, vacas, cabras, ovejas, ciervos y cerdos; Los animales de compañía pueden incluir perros, gatos, conejos, y roedores (incluyendo ratones, ratas, y cobayas). El sujeto puede ser un ser humano.

Generación de una puntuación de riesgo

Los biomarcadores descritos en el presente documento están relacionados con la supervivencia del cáncer. Los modelos diferenciales de expresión de una pluralidad de estos biomarcadores pueden utilizarse para predecir el resultado de la supervivencia de un sujeto con cáncer. Determinados biomarcadores tienden a expresarse en exceso en supervivientes a largo plazo, mientras que otros biomarcadores tienden a expresarse en exceso en supervivientes de a corto plazo. El modelo único de expresión de una pluralidad de biomarcadores en un sujeto (es decir, la firma de expresión) puede utilizarse para generar una puntuación de riesgo de supervivencia. Los sujetos con una puntuación de alto riesgo pueden tener un tiempo de supervivencia corto (< 2 años) tras la resección quirúrgica. Los sujetos con una puntuación de bajo riesgo pueden tener un tiempo de supervivencia más largo (> 5 años) tras la resección.

Independientemente de la técnica utilizada para medir la expresión diferencial de una pluralidad de biomarcadores, la expresión de cada biomarcador se convertirá normalmente en un valor de expresión. Estos valores de expresión se usarán a continuación para calcular una puntuación de riesgo de la supervivencia de un sujeto con cáncer utilizando métodos estadísticos conocidos en la técnica. Las puntuaciones de riesgo pueden calcularse utilizando un análisis de componentes principales. Las puntuaciones de riesgo pueden calcularse también utilizando un análisis de regresión Cox univariante. En una realización preferida, las puntuaciones de riesgo pueden calcularse también utilizando un análisis de regresión Cox parcial.

Las puntuaciones generadas por un análisis de regresión Cox parcial se encuentran comprendidas en los dos grupos: 1) los que tienen un valor positivo; y 2) los que tienen un valor negativo. Una puntuación de riesgo que tiene un valor positivo está asociada con un tiempo de supervivencia corto, y una puntuación de riesgo que tiene un valor negativo está asociada con un tiempo de supervivencia largo.

5 Se puede extraer una muestra de tejido mediante resección quirúrgica de un sujeto con un cáncer en etapa temprana. La muestra de tejido puede almacenarse para extraer el ARN posteriormente o congelarse instantáneamente, de tal manera que el ARN puede aislarse en una fecha posterior. El ARN puede utilizarse como un molde para la QRT-PCR en la que se analiza la expresión de una pluralidad de biomarcadores, y los datos de expresión se usan para derivar una puntuación de riesgo utilizando el método parcial de clasificación de la regresión de Cox. La puntuación del riesgo puede utilizarse para predecir si el sujeto será un superviviente a corto plazo o a largo plazo del cáncer.

15 Preferentemente, una muestra de tejido puede retirarse de un sujeto con una etapa temprana de cáncer. El ARN puede aislarse del tejido y utilizarse para generar sondas marcadas para el análisis de micromatrices de ácido nucleico. Los valores de expresión generados a partir del análisis de la micromatriz pueden utilizarse para derivar una puntuación del riesgo utilizando el método parcial de clasificación de la regresión de Cox. La puntuación del riesgo puede utilizarse para predecir si el sujeto será un superviviente a corto plazo o a largo plazo del cáncer.

20 Método para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer. El método comprende medir la expresión diferencial de uno o más biomarcadores en una muestra de células procedente del sujeto. La expresión diferencial de cada biomarcador se convierte en un valor de expresión, y los valores de expresión se usan para derivar una puntuación de este sujeto utilizando un método estadístico, como se ha detallado anteriormente. Una puntuación que tiene un valor positivo es indicativa de un pronóstico malo o de un resultado malo, mientras que una puntuación que tiene un valor negativo es indicativa de un pronóstico bueno o de un resultado bueno.

30 Una firma de expresión de un sujeto con un cáncer en etapa temprana está generada por análisis de una micromatriz de ácidos nucleicos, y los valores de expresión se usan para calcular una puntuación. La puntuación calculada puede utilizarse para predecir si el sujeto tendrá un pronóstico bueno o un pronóstico malo del resultado del cáncer.

35 Método para seleccionar un tratamiento para un sujeto con cáncer

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un método para seleccionar un tratamiento eficaz para un sujeto con cáncer. Una vez se ha calculado una puntuación de riesgo para un sujeto, esta información se puede usar para decidir un curso adecuado de tratamiento para el sujeto. Un sujeto que tiene una puntuación de riesgo positivo (es decir, un tiempo de supervivencia corto o un pronóstico malo) puede beneficiarse de un régimen de tratamiento agresivo. Un régimen terapéutico agresivo puede comprender el agente o los agentes de quimioterapia adecuados. Un régimen terapéutico agresivo puede comprender también radioterapia. El régimen de tratamiento puede y debe variar, dependiendo del tipo y etapa del cáncer. Un sujeto que tiene una puntuación de riesgo negativa (es decir, tiempo de supervivencia a largo plazo o un pronóstico bueno) puede no necesitar tratamiento adicional, ya que no es probable que el desarrolle un cáncer recurrente.

Las células se mantienen en condiciones en las que uno o más agentes inhiben la expresión o la actividad de las microARN, inhiben la expresión de uno o más genes diana de las microARN, o inhiben una de sus combinaciones, inhibiendo de esta forma la proliferación de las células.

50 Se proporcionan también métodos para identificar un agente que se puede usar para inhibir la proliferación de células cancerosas. El método comprende poner en contacto uno o más microARN con un agente que se va a evaluar; poner en contacto uno o más genes diana con un agente que se va a evaluar; o poner en contacto una de sus combinaciones. Si la expresión de los microARN se inhibe en presencia del agente; o si la expresión de los genes diana se potencia en presencia del agente, o se produce una combinación de los mismos en presencia del agente, entonces el agente puede utilizarse para inhibir la proliferación de células del carcinoma tiroideo folicular.

Método para identificar agentes terapéuticos

60 Se describen también en el presente documento métodos para identificar un agente que se puede usar para tratar un paciente que lo necesita. El método comprende poner en contacto uno o más microARN con un agente que se va a evaluar; poner en contacto uno o más genes diana de uno o más microARN; o poner en contacto una de sus combinaciones. Si la expresión de los microARN se inhibe en presencia del agente; o si la expresión de los genes diana se potencia en presencia del agente, o se produce una combinación de los mismos en presencia del agente, entonces el agente puede utilizarse para inhibir la proliferación de células del carcinoma tiroideo folicular.

Los agentes que se pueden evaluar en los métodos proporcionados en el presente documento incluyen inhibidores del ARNm. Otros ejemplos de dichos agentes incluyen agentes farmacéuticos, fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, ligandos orgánicos, incluyendo cofactores, sacáridos, péptidos recombinantes y sintéticos, proteínas, peptoides, secuencias de ácidos nucleicos, incluyendo genes, productos de ácidos nucleicos, y anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos. Dichos agentes pueden cribarse individualmente o uno o más compuesto(s) pueden someterse a ensayo simultáneamente de acuerdo con los métodos en el presente documento. Se pueden ensayar grandes bibliotecas combinatorias de compuestos (por ejemplo, compuestos orgánicos, péptidos recombinantes o sintéticos, peptoides, ácidos nucleicos) producidos mediante síntesis química combinatoria u otros métodos. Cuando los compuestos seleccionados de una biblioteca combinatoria transportan etiquetas únicas, es posible la identificación de compuestos individuales mediante métodos cromatográficos. Las bibliotecas químicas, los caldos microbianos y las bibliotecas de expresión de fagos también puede someterse a ensayo (cribarse) de acuerdo con los métodos en el presente documento.

Kit para predecir la supervivencia o el pronóstico de un sujeto con cáncer

Otro aspecto de la divulgación proporciona kits para predecir la supervivencia o el pronóstico de un sujeto con cáncer. Un kit comprende una pluralidad de agentes para medir la expresión diferencial de uno o más biomarcadores, lo que significa convertir los datos de expresión en valores de expresión, y significa analizar los valores de expresión para generar puntuaciones que predigan la supervivencia o el pronóstico. Los agentes incluidos en el kit para medir la expresión del biomarcador pueden comprender una matriz de polinucleótidos complementaria con los ARNm de los biomarcadores. Los agentes incluidos en el kit para medir la expresión del biomarcador pueden comprender una pluralidad de sondas y/o cebadores de la PCR para la QRT-PCR.

Se describen también en el presente documento kits para detectar un cáncer en un individuo que comprenden uno o más reactivos para detectar 1) uno o más microARN; 2) uno o más genes diana de uno o más microARN; 3) uno o más polipéptidos expresados por los genes diana o 4) una de sus combinaciones. Por ejemplo, el kit puede comprender sondas de hibridación, enzimas de restricción (por ejemplo, para el análisis de RFLP), oligonucleótidos específicos de alelos, y anticuerpos que se unen al polipéptido expresado por el gen diana.

El kit puede comprender al menos secuencias de nucleótidos contiguas que son sustancial o totalmente complementarias de una región de uno o más de los microARN. Uno de los reactivos del kit puede estar marcado y, de este modo, los kits pueden comprender además agentes capaces de detectar la marca. El kit puede comprender además instrucciones para detectar un cáncer utilizando los componentes del kit.

Matriz de ácidos nucleicos

Otro aspecto de la divulgación proporciona una matriz de ácidos nucleicos que comprende polinucleótidos que se hibridan a los ARNm de los biomarcadores. Hablando de manera general, la matriz de ácidos nucleicos está comprendida por un sustrato que tiene al menos una dirección. Se conocen comúnmente en la técnica matrices de ácidos nucleicos, y además, se conocen bien en la materia los sustratos que comprenden matrices de ácidos nucleicos. Los ejemplos no limitantes de materiales sustrato incluyen vidrio y plástico. Un sustrato puede conformarse de forma análoga a un portaobjetos o a un chip (es decir, una forma cuadrilateral), o como alternativa, un sustrato puede conformarse de forma análoga a un pocillo.

La matriz está comprendida de menos por una dirección, en la que la dirección tiene dispuesta sobre la misma un ácido nucleico que se puede hibridar con el ARNm de un biomarcador. La matriz puede estar comprendida por múltiples direcciones, en la que cada dirección tiene dispuesta sobre la misma un ácido nucleico que se puede hibridar con el ARNm de un biomarcador para predecir la supervivencia de un sujeto con un cáncer de pulmón. La matriz puede comprender también una o más direcciones en las que la dirección tiene dispuesta sobre la misma un ácido nucleico control. El control puede ser un control interno (es decir, un control de la propia matriz) y/o un control externo (es decir, un control de la muestra aplicada a la matriz). Una matriz normalmente está comprendida por entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10.000 direcciones. La matriz puede estar comprendida por entre aproximadamente 10 y aproximadamente 8.000 direcciones, o estar comprendida por no más de 500 direcciones, o estar comprendida de no menos de 500 direcciones. Son bien conocidos en la materia los métodos para utilizar matrices de ácidos nucleicos.

Métodos de uso

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un método para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar leucemia linfoblástica aguda (LLA), que comprende medir el nivel de al menos un producto génico en una muestra de ensayo del sujeto y comparar el nivel del producto génico en la muestra de ensayo con el nivel del producto génico correspondiente en una muestra del control. Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" puede ser cualquier mamífero que tenga, o se sospeche que tenga, cáncer de mama. El sujeto puede ser un ser humano que tiene, o se sospeche que tenga, LLA.

El nivel de al menos un producto génico puede medirse en las células de una muestra biológica obtenida del sujeto. Por ejemplo, se puede extirpar una muestra de tejido de un sujeto sospechoso de tener LLA mediante técnicas de biopsia convencionales. En otro ejemplo, se puede extraer una muestra de sangre del sujeto, y se pueden aislar los glóbulos blancos para la extracción del ADN mediante técnicas normalizadas. La muestra de sangre o tejido se
 5 obtiene preferentemente del sujeto antes del inicio de la radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Se puede obtener un tejido o muestra de sangre control correspondiente a partir de tejidos no afectados del sujeto, procedente de un individuo o una población humana normal de individuos normales, o de células cultivadas correspondientes a la mayoría de células en la muestra del sujeto. El tejido o muestra de sangre control se procesa a continuación junto con la muestra del sujeto, de manera que los niveles de producto génico producidos a partir de
 10 un gen dado en células de la muestra del sujeto pueden compararse con los niveles de productos génicos correspondientes procedentes de células de la muestra del control.

Una alteración (es decir, un aumento o disminución) en el nivel de un producto génico en la muestra obtenida a partir del sujeto, con respecto al nivel de un producto génico correspondiente en una muestra del control, es indicativo de la presencia de LLA en el sujeto. El nivel del al menos un producto génico en la muestra de ensayo puede ser mayor que el nivel del producto génico correspondiente en la muestra del control (es decir, la expresión del producto génico está "regulada en exceso"). Tal como se usa en el presente documento, la expresión de un producto génico está "regulada en exceso" cuando la cantidad de producto génico en una célula o muestra de tejido procedente de un sujeto es mayor que la cantidad del mismo producto génico en la célula o muestra de tejido del control. El nivel del al menos un producto génico en la muestra de ensayo puede ser menor que el nivel del producto génico correspondiente en la muestra del control (es decir, la expresión del producto génico está "regulada por defecto"). Tal como se usa en el presente documento, la expresión de un gen está "regulada por defecto" cuando la cantidad del producto génico producida a partir del gen en una célula o muestra de tejido procedente de un sujeto es menor que la cantidad producida a partir del mismo gen en la célula o muestra de tejido del control. La expresión relativa del gen en las muestras del control y normales puede determinarse con respecto a uno o más patrones de expresión del ARN. Los patrones pueden comprender, por ejemplo, un nivel cero de expresión génica, el nivel de expresión génica en una línea de células normalizada, o el nivel promedio de expresión génica previamente obtenido para una población de controles humanos normales.

El nivel de un producto génico en una muestra puede medirse utilizando cualquier técnica que sea adecuada para detectar niveles de expresión del ARN en una muestra biológica. Las técnicas adecuadas para determinar los niveles de expresión del ARN en células procedentes de una muestra biológica (por ejemplo, el análisis de la transferencia Northern, la RT-PCR, la hibridación in situ) son bien conocidas por los expertos en la materia. El nivel de al menos un producto génico puede detectarse utilizando el análisis de la transferencia Northern. Por ejemplo, se puede purificar el ARN celular total a partir de células mediante homogeneización en presencia de un tampón de extracción de ácido nucleico, seguido por centrifugación. Se precipitan los ácidos nucleicos, y se elimina el ADN mediante tratamiento con ADNasa y precipitación. A continuación, se separan las moléculas de ARN mediante electroforesis en gel sobre geles de agarosa de acuerdo con las técnicas normalizadas, y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. A continuación, se inmoviliza el ARN sobre los filtros mediante calentamiento. La detección y cuantificación del ARN específico se lleva a cabo utilizando sondas de ADN o ARN marcadas adecuadamente complementarias del ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7.

Las sondas adecuadas para la hibridación mediante transferencia Northern de un producto génico dado se pueden producir a partir de secuencias del ácido nucleico de un producto génico dado. Los métodos para la preparación de sondas de ADN y ARN marcadas, y las condiciones para su hibridación con las secuencias de nucleótidos diana, se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11.

Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede marcarse con, por ejemplo, un radionucleido, tal como ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , o ^{35}S ; un metal pesado; o un ligando que puede funcionar como un miembro de un par de unión específico del ligando marcado (por ejemplo, biotina, avidina o un anticuerpo), una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, una enzima o similar.

Se pueden marcar sondas con una elevada actividad específica mediante cualquiera del método de traducción de muescas de Rigby *et al.* (1977), *J. Mol Biol.* 113:237-251 o mediante el método de cebado aleatorio de Fienberg *et al.* (1983), *Anal. Biochem.* 132:6-13. Este último es el método de elección para sintetizar sondas marcadas con ^{32}P de actividad muy específica a partir de moldes de ADN o ARN monocatenario. Por ejemplo, mediante la sustitución de nucleótidos ya existentes con nucleótidos muy radioactivos de acuerdo con el método de traducción de muescas, es posible preparar sondas de ácidos nucleicos marcadas con ^{32}P que tienen una actividad específica muy superior a 10^8 cpm/microgramo. A continuación, puede llevarse a cabo la detección autorradiográfica de la hibridación exponiendo los filtros hibridados a película fotográfica. El barrido densitométrico de las películas fotográficas expuestas a los filtros hibridados proporciona una medida precisa de los niveles de transcritos génicos. Utilizando otro enfoque, los niveles de transcritos génicos se pueden cuantificar utilizando sistemas de diagnóstico por imágenes informatizados, tales como el Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Cuando el radionucleido que marca las sondas de ADN o ARN no es práctico, se puede usar el método del cebador aleatorio para incorporar un análogo, por ejemplo, el análogo de trifosfato de dTTP 5-(N(N-biotinil-epsilon-aminocaproil)3-aminoalil)desoxiuridina, en la molécula de la sonda. El oligonucleótido de la sonda biotinilada puede detectarse mediante reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina, y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra biotina) acoplados a colorantes o enzimas fluorescentes que producen reacciones de color.

Además de la técnica de la transferencia Northern y otras técnicas de hibridación del ARN, se puede llevar a cabo la determinación de los niveles de transcritos de ARN utilizando la técnica de hibridación *in situ*. Esta técnica requiere menos células que la técnica de transferencia Northern, e implica depositar células completas en un cubreobjetos de microscopio y sondear el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contiene sondas de ácido nucleico radioactivo u otro ácido nucleico marcado de otra manera (por ejemplo, ADNc o ARN). Esta técnica es particularmente muy adecuada para analizar muestras de biopsia de tejidos de sujetos. La práctica de la técnica de hibridación *in situ* se describe con más detalle en la patente de EE.UU. N.º 5.427.916. Las sondas adecuadas para la hibridación *in situ* de un producto génico dado se pueden producir a partir de secuencias del ácido nucleico.

Se puede determinar también el número relativo de transcritos génicos en células mediante la transcripción de transcritos génicos, seguido por la amplificación de los transcritos transcritos de forma inversa mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de transcritos génicos se pueden cuantificar en comparación con un patrón interno, por ejemplo, el nivel de ARNm de un gen "constitutivo" presente en la misma muestra. Un gen "constitutivo" adecuado para su uso como un patrón interno incluye, por ejemplo, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los métodos de la RT-PCR cuantitativa y sus variaciones están comprendidos en el nivel de conocimientos de los expertos en la materia.

En algunos casos, puede ser deseable determinar simultáneamente el nivel de expresión de una pluralidad de productos génicos diferentes en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes conocidos correlacionados con un cáncer. Evaluar los niveles de expresión específicos de cáncer para cientos de genes es muy laborioso y requiere una gran cantidad de ARN total (al menos 20 µg para cada transferencia Northern) y técnicas autorradiográficas que requieren isótopos radioactivos.

Para mitigar estas limitaciones, se puede construir una biblioteca de oligonucleótidos en formato microchip (es decir, una micromatriz), que contiene un conjunto de sondas de oligodesoxinucleótidos que son específicas de un conjunto de genes o productos génicos. Utilizando dicha micromatriz, se puede determinar el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica transcribiendo de manera inversa los ARN para generar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, e hibridarlos con una sonda de oligodesoxinucleótidos sobre la micromatriz para generar una hibridación, o perfil de expresión. El perfil de hibridación de la muestra de ensayo puede a continuación compararse con el de una muestra control para determinar cuáles microARN han alterado el nivel de expresión en LLA. Tal como se usa en el presente documento, "sonda de oligonucleótidos" o "sonda de oligodesoxinucleótidos" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con un oligonucleótido diana. "oligonucleótido diana" u "oligodesoxinucleótido diana" se refiere a una molécula que se va a detectar (por ejemplo, mediante hibridación). Por "sonda de oligonucleótidos específica" o "sonda de oligonucleótidos específica de un producto génico" se entiende una sonda de oligonucleótidos que tiene una secuencia seleccionada para hibridarse con un producto génico específico, o un transcrito inverso del producto génico específico.

Un "perfil de expresión" o "perfil de hibridación" de una muestra concreta es esencialmente una huella digital del estado de la muestra; aunque dos estados pueden tener cualquier gen concreto expresado de forma similar, la evaluación de numerosos genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génica que es único para el estado de la célula. Es decir, las células normales pueden distinguirse de las células LLA, y en las células LLA, se pueden determinar diferentes estados pronósticos (perspectivas de supervivencia buenas o malas a largo plazo, por ejemplo). Mediante la comparación de los perfiles de expresión de células LLA en diferentes estados, se obtiene la información con respecto a qué genes son importantes (incluyendo la regulación por exceso y por defecto de los genes) en cada uno de estos estados. La identificación de las secuencias que se expresan de manera diferente en células LLA o células normales, así como la expresión diferencial que da como resultado diferentes resultados pronósticos, permite el uso de esta información de numerosas maneras. Por ejemplo, se puede evaluar un régimen de tratamiento concreto (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico mejora el pronóstico a largo plazo en un paciente concreto). De manera similar, el diagnóstico puede llevarse a cabo o confirmarse comparando muestras de pacientes con los perfiles de expresión conocidos. Adicionalmente, estos perfiles de expresión (o los genes individuales) permiten el cribado de fármacos candidatos que suprimen el perfil de expresión de LLA o convierte un perfil de pronóstico malo en un perfil de pronóstico mejor.

De acuerdo con ello, esta divulgación proporciona métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, LLA, que comprende transcribir de forma inversa el ARN de una muestra de ensayo obtenido del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende una sonda de oligonucleótidos específica de ARNmi para proporcionar un perfil de hibridación específico de la muestra de ensayo, y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control, en el que una alteración en la señal de al menos un

ARNmi es indicativa de un sujeto cualquiera que tiene, o está en riesgo de desarrollar, LLA.

Esta divulgación proporciona también métodos para diagnosticar una LLA asociada con uno o más marcadores de pronóstico, que comprenden medir el nivel de al menos un producto génico en una muestra de ensayo de LLA
5 procedente de un sujeto y comparar el nivel de el al menos un producto génico en la muestra de ensayo de LLA con el nivel de un producto génico correspondiente en una muestra del control. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una disminución) en la señal de al menos un producto génico en la muestra de ensayo comparada con la muestra del control es indicativa de un sujeto cualquiera que tiene, o está en riesgo de desarrollar, LLA asociada con el uno o más marcadores de pronóstico.

10 La LLA puede estar asociada con uno o más marcadores o características de pronóstico, incluyendo, un marcador asociado con un pronóstico adverso (es decir, negativo), o un marcador asociado con un pronóstico bueno (es decir, positivo). La LLA que se ha diagnosticado usando los métodos descritos en el presente documento puede estar asociada con una o más características de pronósticos adversos.

15 Se describen en el presente documento los microARN concretos cuya expresión está alterada en células LLA asociadas con cada uno de estos marcadores de pronóstico. El nivel del al menos un producto génico puede medirse transcribiendo de forma inversa el ARN procedente de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una
20 micromatriz que comprende una sonda de oligonucleótidos específica de ARNmi para proporcionar un perfil de hibridación específico de la muestra de ensayo, y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control.

25 Aunque sin desear quedar ligado por teoría particular alguna, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos en células puede dar como resultado la desregulación de una o más dianas previstas para estos productos génicos, que puede dar lugar a la formación de LLA. Por tanto, alterar el nivel del producto génico (por ejemplo, disminuyendo el nivel de un producto génico que está regulado en exceso en células de LLA, aumentando el nivel de un producto génico que está regulado por defecto en células cancerosas) puede tratar satisfactoriamente la LLA. Se describen en el presente documento ejemplos de presuntas dianas génicas de productos génicos que
30 están desreguladas en las células de LLA.

De acuerdo con ello, la presente divulgación abarca métodos para tratar la LLA en un sujeto, en el que al menos un producto génico está desregulado (por ejemplo, regulado por defecto, regulado por exceso) en las células cancerosas del sujeto. Cuando el al menos un producto génico aislado está regulado por defecto en las células de
35 LLA, el método comprende administrar una cantidad eficaz del al menos un producto génico aislado de tal manera que se inhiba la proliferación de células cancerosas en el sujeto. Cuando el al menos un producto génico aislado está regulado por exceso en las células cancerosas, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un gen, que en el presente documento se denominan compuestos de inhibición de la expresión génica, de tal manera que se inhibe la proliferación de células de LLA.

40 Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a mejorar los síntomas asociados con una enfermedad o dolencia, por ejemplo, LLA, incluyendo prevenir o retrasar el comienzo de los síntomas de la enfermedad, y/o disminuir la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad o dolencia. Los términos "sujeto" e "individuo" se definen en el presente documento para incluir animales, tales como
45 mamíferos, incluyendo pero sin limitarse a, especies de primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otros bovinos, ovinos, equinos, cánidos, felinos, roedores, o murinos. Preferentemente el animal es un ser humano.

50 Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un producto génico aislado es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que padece de LLA. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un producto génico que se va a administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores, tales como el tamaño y el peso del sujeto; la extensión de la penetración de la enfermedad; la edad, salud y sexo del sujeto; la ruta de administración; y si la administración es regional o sistémica.

55 Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico aislado puede estar basada en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto que se va a tratar. Preferentemente, dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o entérica, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del producto génico aislado que se administra a un sujeto puede variar entre aproximadamente 5 - 3000 microgramos/kg de peso corporal, entre aproximadamente 700 - 1000 microgramos/kg de peso corporal, o más de aproximadamente 1000 microgramos/kg de peso corporal.

60 Un experto en la materia puede determinar también fácilmente un régimen de dosificación adecuado para la administración de un producto génico aislado a un sujeto dado. Por ejemplo, se puede administrar un producto génico al sujeto una vez (por ejemplo, como una única inyección o depósito). Como alternativa, un producto génico puede administrarse una vez o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de entre aproximadamente tres a
65

aproximadamente veintiocho días, de forma más concreta entre aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación concreto, un producto génico se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz del producto génico administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de producto génico administrada en el régimen de dosificación completo.

Tal como se usa en el presente documento, un producto génico "aislado" es aquel que se sintetiza, o altera o elimina del estado natural a través de la intervención humana. Por ejemplo, un producto génico sintético, o un producto génico parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural, se considera que está "aislado". Un producto génico aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en una célula en la que se ha administrado el producto génico. De esta manera, un producto génico que se administra de forma deliberada a, o se expresa en, una célula, se considera un producto génico "aislado". Un producto génico producido en el interior de una célula a partir de una molécula precursora se considera también que es una molécula "aislada".

Se pueden obtener productos génicos aislados utilizando numerosas técnicas normalizadas. Por ejemplo, los productos génicos se pueden sintetizar químicamente o producirse de forma recombinante utilizando los métodos conocidos en la materia. Los productos génicos pueden sintetizarse químicamente usando fosforamiditas de ribonucleósido adecuadamente protegidas y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los proveedores comerciales de moléculas de ARN sintéticas o reactivos de síntesis incluyen, por ejemplo, Prologo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE.UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE.UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE.UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE.UU.) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido).

Como alternativa, los productos génicos pueden expresarse a partir de plásmidos de ADN circulares o lineales utilizando un promotor adecuado. Los promotores adecuados para expresar el ARN de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras de U6 o el HI ARN de pol III, o los promotores del citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está comprendida en los conocimientos de los expertos en la materia. Los plásmidos recombinantes de la invención pueden comprender también promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos en células cancerosas.

Los productos génicos que se expresan a partir de plásmidos recombinantes pueden aislarse a partir de sistemas de expresión de células cultivadas mediante técnicas normalizadas. Los productos génicos que se expresan a partir de plásmidos recombinantes pueden también administrarse a, y expresarse directamente en, las células cancerosas. Se describe con más detalle a continuación el uso de plásmidos recombinantes para administrar los productos génicos a células cancerosas.

Los productos génicos pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante independiente, o se pueden expresar a partir del mismo plásmido recombinante. Los productos génicos pueden expresarse como moléculas precursoras de ARN a partir de un único plásmido, y las moléculas precursoras se procesan para obtener el producto génico funcional mediante un sistema de procesamiento adecuado, que incluye, pero sin limitación, sistemas de procesamiento existentes en una célula cancerosa. Otros sistemas de procesamiento adecuados incluyen, por ejemplo, el sistema de lisados celulares de *Drosophila in vitro* (por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos N.º 2002/0086356 de Tuschl *et al.*) y el sistema ARNasa III de *E. coli* (por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos N.º 2004/0014113 de Yang *et al.*).

La elección de plásmidos adecuada para expresar los productos génicos, los métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos en el plásmido para expresar los productos génicos, y los métodos para administrar el plásmido recombinante a las células de interés están comprendidos en los conocimientos de los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Zeng *et al.* (2002), *Molecular Cell* 9:1327-1333; Tuschl (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:446-448; Brummelkamp *et al.* (2002), *Science* 296:550-553; Miyagishi *et al.* (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:497-500; Paddison *et al.* (2002), *Genes Dev.* 16:948-958; Lee *et al.* (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:500-505; y Paul *et al.* (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:505-508.

Un plásmido que expresa los productos génicos comprende una secuencia que codifica un ARN precursor bajo el control del promotor temprano intermedio de CMV. Tal como se usa en el presente documento, "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el producto génico se localizan en 3' con respecto al promotor, de tal manera que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias de codificación del producto génico.

Los productos génicos se pueden expresar también a partir de vectores víricos recombinantes. Se contempla que los productos génicos se puedan expresar a partir de dos vectores víricos recombinantes independientes, o a partir del mismo vector vírico. El ARN expresado a partir de los vectores víricos recombinantes puede aislarse bien a partir de sistemas de expresión de células cultivadas mediante técnicas normalizadas, o bien se puede expresar directamente en células cancerosas. El uso de vectores víricos recombinantes para administrar los productos

génicos a las células cancerosas se describe con más detalle a continuación.

Los vectores víricos recombinantes comprenden secuencias que codifican los productos génicos y cualquier promotor adecuado para la expresión de secuencias de ARN. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras de U6 o el HI ARN de pol III, o los promotores del citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está comprendida en los conocimientos de los expertos en la materia. Los vectores víricos recombinantes pueden comprender también promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos en una célula cancerosa.

Se puede usar cualquier vector vírico que pueda aceptar las secuencias de codificación de los productos génicos; por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (VA); virus adenoasociados (VAA); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rabdovirus, virus de la leucemia de murino); virus del herpes, y similares. Se puede modificar el tropismo de los vectores víricos mediante pseudotipado de los vectores con proteínas de la envuelta u otros antígenos superficiales procedentes de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de cápsidas víricas, según sea adecuado.

Por ejemplo, se pueden pseudotipar vectores lentivíricos con proteínas superficiales procedentes del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, ébola, mokola, y similares. Se pueden preparar vectores de VAA para que se dirijan a células diferentes mediante el diseño por ingeniería de vectores que expresan diferentes serotipos de proteínas de cápsidas. Por ejemplo, un vector de VAA que expresa una cápsida del serotipo 2 o un genoma del serotipo 2 se denomina VAA/2/2. Este gen de la cápsida del serotipo 2 en el vector VAA/2/2 puede sustituirse por un gen de cápsida de serotipo 5 para producir un vector VAA 2/5. Las técnicas para producir vectores de VAA que expresan diferentes serotipos de proteínas de cápsidas están comprendidas en los conocimientos de los expertos en la materia; véase, por ejemplo, Rabinowitz, J. E., *et al.* (2002), *J. Virol.* 76:791-801.

La selección de vectores víricos recombinantes adecuados para su uso en la invención, los métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar ARN en el vector, los métodos para administrar el vector vírico a las células de interés, y la recuperación de los productos de ARN expresados están comprendidos en los conocimientos de los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Dornburg (1995), *Gene Therap.* 2:301-310; Eglitis (1988), *Biotechniques* 6:608-614; Miller (1990), *Hum. Gene Therap.* 1:5-14; y Anderson (1998), *Nature* 392:25-30.

Los vectores víricos adecuados pueden ser aquellos derivados de VA y VAA. Un vector VA adecuado para expresar los productos génicos, un método para construir el vector VA recombinante, y un método para administrar el vector a células diana, se describen en Xia *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20:1006-1010. Los vectores VAA adecuados para expresar los productos génicos, los métodos para construir el vector VAA recombinante, y los métodos para administrar los vectores en células diana se describen en Samulski *et al.* (1987), *J. Virol.* 61:3096-3101; Fisher *et al.* (1996), *J. Virol.* 70:520-532; Samulski *et al.* (1989), *J. Virol.* 63:3822-3826; patente de EE.UU. N.º 5.252.479; patente de EE.UU. N.º 5.139.941; solicitud de patente internacional N.º WO 94/13788; y solicitud de patente internacional N.º WO 93/24641.

Un vector vírico VAA puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor en unión funcional con una secuencia poliT de terminación bajo el control de un promotor de ARN de U6 humano. Tal como se usa en el presente documento, "en unión funcional con una secuencia poliT de terminación" significa que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las hebras de sentido directo o de sentido contrario se encuentran inmediatamente adyacentes a la señal de terminación de PoliT en la dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias del vector, las señales de terminación de poliT actúan para terminar la transcripción.

Se puede administrar también al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto que inhibe la expresión. Tal como se usa en el presente documento, "inhibir la expresión del gen" significa que la producción de la forma madura activa del producto génico después del tratamiento es menor que la cantidad producida antes del tratamiento. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si se ha inhibido la expresión en una célula cancerosa, utilizando por ejemplo las técnicas para determinar el nivel de transcritos descrito anteriormente para el método diagnóstico. Se puede producir la inhibición durante la expresión génica (es decir, inhibiendo la transcripción de un gen que codifica el producto génico) o durante el procesamiento (por ejemplo, inhibiendo el procesamiento de un precursor para obtener un producto génico activo maduro).

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un compuesto que inhibe la expresión es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de un cáncer asociado con una característica cromosómica asociada a cáncer. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor de la expresión que se va a administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores, tales como el tamaño y el peso del sujeto; la extensión de la penetración de la enfermedad; la edad, salud y sexo del sujeto; la ruta de administración; y si la administración es regional o sistémica.

Por ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto inhibidor de la expresión puede estar basada en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto que se va a tratar. Dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o entérica, entre otras, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto

inhibidor de la expresión administrada a un sujeto puede variar entre aproximadamente 5 - 3000 microgramos/kg de peso corporal, entre aproximadamente 700 - 1000 microgramos/kg de peso corporal, o puede ser mayor de aproximadamente 1000 microgramos/kg de peso corporal.

5 Un experto en la materia puede determinar también fácilmente un régimen de dosificación adecuado para la administración de compuesto que inhibe la expresión de un sujeto dado. Por ejemplo, se puede administrar un compuesto inhibidor de la expresión al sujeto una vez (por ejemplo, como una única inyección o depósito). Como alternativa, se puede administrar una vez o dos veces al día un compuesto inhibidor de la expresión a un sujeto durante un periodo de entre aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más preferentemente entre
10 aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación concreto, un compuesto inhibidor de la expresión se administra una vez durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz del compuesto inhibidor de la expresión administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de compuesto administrada durante el régimen de dosificación completo.

15 Los compuestos adecuados para inhibir la expresión incluyen ARN bicatenario (tal como un ARN interferente corto o pequeño o "ARNip"), los ácidos nucleicos de sentido contrario, y las moléculas de ARN enzimático, tales como ribozimas. Cada uno de estos compuestos puede dirigirse a un producto génico dado y destruir o inducir la destrucción del producto génico diana.

20 Por ejemplo, puede inhibirse la expresión de un gen dado induciendo la interferencia del ARN del gen con una molécula de ARN bicatenario aislado ("ARNds") que tiene al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o 100 %, de homología de la secuencia con al menos una porción del producto génico. La molécula de ARNds es un "ARN interferente corto o pequeño" o "ARNip".

25 El ARNip útil en los presentes métodos comprende un ARN bicatenario corto de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El ARNip comprende una hebra de ARN de sentido directo y una hebra de ARN de sentido contrario complementaria hibridadas entre sí mediante las interacciones de emparejamiento de bases de Watson-Crick (a partir de ahora en el presente documento "base emparejada"). La hebra de sentido directo comprende una
30 secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ácido nucleico contenida en el producto del gen diana.

35 Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico en un ARNip que es "sustancialmente idéntica" a una secuencia diana contenida en el ARNm diana es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana, o que difiere de la secuencia diana en uno o dos nucleótidos. Las hebras de sentido directo y sentido contrario del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenario complementarias, o pueden comprender una única molécula en la que dos porciones complementarias están emparejadas por las bases y están unidas covalentemente por una zona "de horquilla" monocatenaria.

40 El ARNip puede alterar también el ARN que difiere del ARN que se produce naturalmente mediante la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, de tal manera que los extremo(s) del ARNip o de uno o más nucleótidos internos del ARNip, o las modificaciones que convierten el ARNip en resistente a la digestión de la nucleasa, o la sustitución de uno o
45 más nucleótidos en el ARNip con desoxinucleótidos.

Una o ambas hebras del ARNip pueden comprender también un saliente 3'. Tal como se usa en el presente documento, un "saliente 3'" se refiere a al menos un nucleótido desemparejado que se extiende desde el extremo 3' de una hebra de ARN duplexada. De esta manera, el ARNip puede comprender al menos un saliente 3' de 1 a
50 aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. El saliente 3' puede estar presente en ambas hebras del ARNip, y tiene 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra del ARNip puede comprender salientes 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

55 El ARNip puede producirse química o biológicamente, o se puede expresar a partir de un plásmido recombinante o vector vírico, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos aislados. Los métodos ilustrativos para producir y ensayar moléculas de ARNds o ARNip se describen en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos N.º 2002/0173478 de Gewirtz y en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos N.º 2004/0018176 de Reich *et al.*
60

La expresión de un gen dado puede también inhibirse mediante un ácido nucleico de sentido contrario. Tal como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico de sentido contrario" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une a un ARN diana por medio de interacciones de ácidos nucleicos ARN-ARN o ARN-ADN o ARN-péptido, que alteran la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos de sentido contrario adecuados para su uso en los
65 presentes métodos son ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ARN, ADN, quimeras de ARN-ADN, PNA)

que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria de una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico. El ácido nucleico de sentido contrario puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene un 50-100 % de complementariedad, 75-100 % de complementariedad, o 95-100 % de complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico. Se proporcionan en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos para los productos génicos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que los ácidos nucleicos de sentido contrario activan la ARNasa H u otra nucleasa celular que digiere el producto génico/duplete de ácido nucleico de sentido contrario.

Los ácidos nucleicos de sentido contrario pueden contener también modificaciones en la estructura del ácido nucleico o en los restos azucarados y de bases (o sus equivalentes) para aumentar la especificidad hacia la diana, la resistencia a nucleasas, la administración u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Dichas modificaciones incluyen restos de colesterol, intercaladores de dupletes, tales como acridina, o uno o más grupos resistentes a las nucleasas.

Se pueden producir química o biológicamente ácidos nucleicos de sentido contrario, o se puede expresar a partir de un plásmido recombinante o vector vírico, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos aislados. Los métodos ilustrativos para la producción y el ensayo están comprendidos en el nivel de conocimientos de los expertos en la materia; véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), *Science* 261:1004 y patente de Estados Unidos N.º 5.849.902 de Woolf *et al.*

La expresión de un gen dado puede estar también inhibida por un ácido nucleico enzimático. Tal como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión a sustrato que tiene complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contigua de un producto génico, y que puede escindir específicamente el producto génico. La región de unión a sustrato del ácido nucleico enzimático puede ser, por ejemplo, 50-100 % de complementariedad, 75-100 % de complementariedad, o 95-100 % de complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico. Los ácidos nucleicos enzimáticos pueden comprender también modificaciones en la base, azúcar, y/o grupos fosfato. Un ácido nucleico enzimático ilustrativo para su uso en los presentes métodos es una ribozima.

Los ácidos nucleicos enzimáticos pueden producirse química o biológicamente, o se puede expresar a partir de un plásmido recombinante o vector vírico, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos aislados. Los métodos ilustrativos para producir y ensayar moléculas de ARNs o ARNip se describen en Werner y Uhlenbeck (1995), *Nucl. Acids Res.* 23:2092-96; Hammann *et al.* (1999), *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.* 9:25-31; y en la patente de Estados Unidos N.º 4.987.071 de Cech *et al.*

La administración de al menos un producto génico, o al menos de un compuesto para inhibir la expresión inhibirá la proliferación de células cancerosas en un sujeto que tiene un cáncer asociado con una característica cromosómica asociada a cáncer. Tal como se usa en el presente documento, "inhibir la proliferación de una célula cancerosa" significa destruir la célula, o detener o retrasar de forma permanente o temporal el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación de células cancerosas puede inferirse si el número de dichas células en el sujeto permanece constante o disminuye tras la administración de los productos génicos o de los compuestos inhibidores de la expresión génica. Puede inferirse también una inhibición de la proliferación de células cancerosas si el número absoluto de dichas células aumenta, pero disminuye la velocidad del crecimiento tumoral.

El número de células cancerosas en el cuerpo de un sujeto puede determinarse mediante medida directa, o mediante estimación del tamaño de las masas tumorales primarias o metastásicas. Por ejemplo, puede medirse el número de células cancerosas en un sujeto mediante métodos inmunohistoquímicos, citometría de flujo, u otras técnicas diseñadas para detectar marcadores superficiales característicos de células cancerosas.

Los productos génicos o compuestos inhibidores de la expresión pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier medio adecuado para administrar estos compuestos a las células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos o compuestos inhibidores de la expresión pueden administrarse mediante métodos adecuados para transfectar células del sujeto con estos compuestos, o con ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican estos compuestos. Las células pueden transfectarse con un plásmido o vector vírico que comprenden las secuencias que codifican al menos un producto génico o compuesto inhibidor de la expresión génica.

Son bien conocidos en la materia los métodos de transfección de células eucariotas, e incluyen, por ejemplo, inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de una célula; electroporación; transferencia de liposomas o transferencia mediada por materiales lipófilos; administración de ácidos nucleicos mediada por receptor, biobalística o aceleración de partículas; precipitación con fosfato de calcio, y transfección mediada por vectores víricos.

Por ejemplo, se pueden transfectar células con un compuesto de transferencia de liposomas, por ejemplo, DOTAP metilsulfato de (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio, Boehringer Mannheim) o un equivalente, tal como LIPOFECTIN. La cantidad de ácido nucleico utilizada no es crítica para la práctica de la invención; se pueden conseguir resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico/10⁵ 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.

Un producto génico o compuesto inhibidor de la expresión génica puede también administrarse a un sujeto mediante cualquier ruta de administración entérica o parenteral adecuada. Las rutas de administración entérica adecuadas para los presentes métodos incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, o intranasal. Las rutas de administración parenterales adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (por ejemplo, inyección de bolo intravenoso, infusión intravenosa, inyección de bolo intraarterial, infusión intraarterial en instilación mediante catéter en la vasculatura); inyección peri e intratisular (por ejemplo, inyección peritumoral e intratumoral, inyección intrarretinal, o inyección subretinal); inyección o deposición subcutánea, incluyendo infusión subcutánea (tal como mediante bombas osmóticas); aplicación directa al tejido de interés, por ejemplo, mediante un catéter u otro dispositivo de sustitución (por ejemplo, un aglomerado retinal o un supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso, o gelatinoso); e inhalación. Las rutas de administración particularmente adecuadas son inyección, infusión e administración intravenosa al paciente.

En los presentes métodos, un producto génico o el compuesto que inhibe la expresión de producto génico se puede administrar al sujeto tanto como ARN puro, combinado con un reactivo de administración, o como un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido recombinante o vector vírico) que comprende secuencias que expresan el producto génico o el compuesto que inhibe la expresión. Los reactivos de administración adecuados incluyen, por ejemplo, el reactivo lipófilo Mirus Transit TKO; lipofectina; lipofectamina; celfectina; policationes (por ejemplo, polilisina), y liposomas.

Se describen en el presente documento los plásmidos recombinantes y los vectores víricos que comprenden secuencias que expresan los productos génicos o los compuestos que inhiben la expresión génica, y las técnicas para administrar dichos plásmidos y vectores a células cancerosas.

Los liposomas se usan para administrar un producto génico o compuesto inhibidor (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a un sujeto. Los liposomas pueden también aumentar la vida media en sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos. Los liposomas adecuados para su uso en la invención pueden formarse a partir de lípidos formadores de vesículas convencionales, que incluyen generalmente fosfolípidos neutros o cargados negativamente y esteroides, tales como colesterol. La selección de lípidos está guiada generalmente por una consideración de factores, tal como el tamaño deseado de los liposomas y la vida media de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se conocen varios métodos para preparar liposomas, por ejemplo, como se describe en Szoka *et al.* (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467; y en la patente de Estados Unidos N^{os}. 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, y 5.019.369.

Los liposomas para su uso en los presentes métodos pueden comprender una molécula de ligando que dirige el liposoma a las células cancerosas. Se prefieren ligandos que se unen a los receptores prevalentes en células cancerosas, tales como anticuerpos monoclonales que se unen a los antígenos de células tumorales.

Los liposomas para su uso en los presentes métodos pueden también modificarse para evitar el aclaramiento por el sistema macrófago mononuclear ("MMS") y el sistema reticuloendotelial ("RES"). Dichos liposomas modificados tienen restos de opsonización-inhibición sobre la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. Un liposoma puede comprender restos de opsonización-inhibición y un ligando.

Los restos de opsonización-inhibición para su uso en la preparación de liposomas son normalmente polímeros hidrófilos grandes que se unen a la membrana del liposoma. Tal como se usa en el presente documento, un resto inhibidor de la opsonización está "unido" a una membrana de liposoma cuando se une química o físicamente a la membrana, por ejemplo, mediante la intercalación de un anclaje lípido soluble en la propia membrana, o uniéndose directamente a los grupos activos de los lípidos de membrana. Estos polímeros hidrófilos inhibidores de la opsonización forman una capa superficial protectora que disminuye significativamente la captación de liposomas por el MMS y RES; por ejemplo, como se describe en la Patente de los 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 peso molecular promedio en número de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 daltons, y más preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 daltons. Dichos polímeros incluyen derivados de polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG); por ejemplo, metoxi PEG o PPG, y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poliacrilamida o poli N-vinil pirrolidona; o poliamidoaminas lineales, ramificadas o dendrímicas; ácidos poliacrílicos; polialcoholes, por ejemplo, polialcohol vinílico y polixilitol al cual se unen químicamente grupos carboxílicos o amino, así como gangliósidos, tales como gangliósido GMI. Son también adecuados los copolímeros de PEG, metoxi PEG, o metoxi PPG, o sus derivados. Además, el polímero inhibidor de la opsonización puede ser un copolímero de bloqueo de PEG y cualquiera de un poliaminoácido, polisacárido, poliamidoamina, polietilenamina, o polinucleótido. Los polímeros inhibidores de la opsonización pueden ser también polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido mannanurónico, ácido hialurónico, ácido péptico, ácido neuramínico, ácido alginico, carragenato; polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por

ejemplo, que se han hecho reaccionar con derivados de ácidos carbónicos con unión resultante de grupos carboxílicos. Preferentemente, el resto de opsonización-inhibición es un PEG, PPG, o derivados del mismo. Los liposomas modificados con PEG o derivados de PEG se denominan algunas veces "liposomas PEGilados".

- 5 El resto de opsonización-inhibición se puede unir a la membrana del liposoma mediante una cualquiera de numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG se puede unir a un anclaje de fosfatidil-etanolamina soluble en lípidos, y a continuación unirse a una membrana. De manera similar, se puede derivatizar un polímero de dextrano con un anclaje de estearilamina soluble en lípidos mediante aminación reductora utilizando $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ y una mezcla disolvente, tal como tetrahidrofurano y agua en una relación 30:12 a
10 60 %.

Los liposomas modificados con los restos de opsonización-inhibición permanecen en la circulación mucho más que los liposomas sin modificar. Por este motivo, dichos liposomas se denominan algunas veces liposomas "sigilosos". Se sabe que los liposomas sigilosos se acumulan en tejidos alimentados por microvasculatura porosa o con "pérdidas". De esta manera, el tejido caracterizado por dichos defectos de microvasculatura, por ejemplo, tumores sólidos, acumulará eficazmente estos liposomas; véase Gabizon, *et al.* (1988), Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A., 18:6949-53. Además, la captación reducida por el RES disminuye la toxicidad de los liposomas sigilosos evitando la acumulación significativa de los liposomas en el hígado y el bazo. De esta manera, los liposomas que están modificados con los restos de opsonización-inhibición son particularmente adecuados para administrar productos
15 génicos o compuestos de inhibición de la expresión génica (o ácidos nucleicos que comprenden las secuencias que los codifican) a células tumorales.

Los productos génicos o compuestos inhibidores de la expresión génica se pueden formular como composiciones farmacéuticas, denominadas algunas veces "medicamentos" antes de administrarlos a un sujeto, de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia. De acuerdo con ello, esta divulgación abarca las composiciones farmacéuticas para tratar la LLA. Las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico aislado y un transportador farmacéuticamente aceptable. El al menos un producto génico puede corresponder a un producto
20 génico que tiene un nivel disminuido de expresión en células LLA con respecto a las células del control adecuadas.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos un compuesto inhibidor de la expresión. El al menos un compuesto inhibidor de la expresión puede ser específico de un gen cuya expresión es mayor en células LLA que en células del control.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se caracterizan por ser casi estériles y exentas de pirógenos. Tal como se usa en el presente documento, las "formulaciones farmacéuticas" incluyen formulaciones para uso humano y veterinario. Los métodos para preparar dichas composiciones farmacéuticas están comprendidos en los conocimientos de los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Science, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985).

40 Las presentes formulaciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico o compuesto inhibidor de la expresión génica (o al menos un ácido nucleico que comprende las secuencias que codifican los anteriores) (por ejemplo, de 0,1 a 90 % en peso), o una de sus sales fisiológicamente aceptables, mezclado con un transportador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender también al menos un producto génico o compuesto inhibidor de la expresión génica (o al menos un ácido nucleico que comprende las secuencias
45 que codifican los anteriores) que se han encapsulado en un liposoma, y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Los transportadores farmacéuticamente aceptables especialmente adecuados son agua, agua tamponada, suero salino normal, suero salino al 0,4 %, glicina al 0,3 %, ácido hialurónico y similares.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos un producto génico o compuesto inhibidor de la expresión génica (o al menos un ácido nucleico que comprende las secuencias que codifican los anteriores) que sea resistente a la degradación mediante nucleasas. Una persona experta en la materia puede sintetizar fácilmente ácidos nucleicos que sean resistentes a nucleasas, por ejemplo, mediante la incorporación de uno o más ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' en los productos génicos. Los ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' adecuados incluyen los que están modificados en la posición 2 con flúor, amino, alquilo, alcoxi, y O-alilo.

60 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizantes, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones, y agentes de ajuste del pH. Los aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente biocompatibles (por ejemplo, clorhidrato de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos quelantes de calcio (tales como, por ejemplo, calcio DTPA, CaNaDTPA-bisamida), o, de manera opcional, adicionales de sales de calcio o sodio (por ejemplo, cloruro de calcio, ascorbato de calcio, gluconato de calcio o lactato de calcio). Las composiciones farmacéuticas se pueden envasar para su uso en forma líquida, o se pueden liofilizar.

65

Para las composiciones farmacéuticas sólidas, los transportadores sólidos no tóxicos convencionales farmacéuticamente aceptables pueden incluir; por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares.

- 5 Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los transportadores y excipientes relacionados anteriormente y 10-95 %, preferentemente 25 % - 75 %, de al menos un producto génico o compuesto inhibidor de la expresión génica (o al menos un ácido nucleico que comprende las secuencias que codifican los anteriores). Una composición farmacéutica para su administración en aerosol (para inhalación) puede comprender 0,01-20 % en peso, preferentemente 1 % -10 % en peso, de al menos un producto
- 10 génico o compuesto inhibidor de la expresión génica (o al menos un ácido nucleico que comprende las secuencias que codifican los anteriores) encapsulado en un liposoma como se ha descrito anteriormente, y un propulsor. También se puede incluir un transportador si se desea; por ejemplo, lecitina para administración intranasal.

15 Esta divulgación también abarca métodos para identificar un agente contra la LLA, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico en la célula. El método puede comprender proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico asociado con una disminución de los niveles de expresión de LLA en la célula. Un aumento en el nivel del producto génico en la célula, con respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente contra la LLA.

20 El método puede comprender proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico asociado con un aumento de los niveles de expresión de LLA en la célula. Una disminución en el nivel del producto génico en la célula, con respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente contra la LLA.

25 Los agentes adecuados incluyen, pero no se limitan a fármacos (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos), y macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos). El agente se puede producir de forma recombinante, sintética, o puede estar aislado (es decir, purificado) a partir de una fuente natural. Se conocen bien en la técnica varios métodos para proporcionar dichos agentes a una célula (por ejemplo, transfección), y varios de dichos métodos se han descrito anteriormente en el presente documento. Los métodos para detectar la expresión de

30 al menos un producto génico (por ejemplo, transferencia Northern, hibridación in situ, RT-PCR, perfilado de expresión) son bien conocidos en la materia.

DEFINICIONES

35 El término "matriz" se utiliza de forma indistinta con el término "micromatriz" en el presente documento.

El término "cáncer" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la dolencia fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por una proliferación celular no regulada, y a la capacidad de dichas células para invadir otros tejidos.

40

El término "expresión" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la conversión de la información de la secuencia de ADN en un ARN mensajero (ARNm) o proteína. Se puede realizar un seguimiento de la expresión midiendo los niveles del ARNm de longitud completa, fragmentos de ARNm, proteína de longitud completa, o fragmentos de proteína.

45

Se pretende que el término "proteína de fusión" describa al menos dos polipéptidos, normalmente de fuentes diferentes, que están unidos entre sí de forma funcional. Con respecto a los polipéptidos, se pretende que la expresión "unido de forma funcional" signifique que los dos polipéptidos están conectados de tal forma que cada polipéptido sirve a su función prevista. Normalmente, los dos polipéptidos están unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. La proteína de fusión se produce preferentemente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica el primer polipéptido se liga a otra molécula de ADN que codifica el segundo polipéptido, y la molécula de ADN híbrido resultante se expresa en una célula hospedadora para producir la proteína de fusión. Las moléculas de ADN están ligadas entre sí en una orientación 5' a 3' de tal forma que, tras la unión, el marco de traducción de los polipéptidos codificados no se altera (es decir, las moléculas de ADN están ligadas entre si en el marco).

50

55

La expresión "firma de la expresión génica", tal como se usa en el presente documento, se refiere al modelo único de expresión génica en una célula, y en particular, una célula cancerosa.

60

El término "hibridación" tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de unión, hibridación, o emparejamiento de bases entre dos ácidos nucleicos monocatenarios. La "rigurosidad de la hibridación" se determina por las condiciones de temperatura y fuerza iónica. La estabilidad del ácido nucleico híbrido se expresa por su temperatura de fusión, o Tm, que es la temperatura a la cual el híbrido está desnaturalizado en un 50 % en condiciones definidas. Se han derivado ecuaciones para estimar la Tm de un híbrido dado; las ecuaciones tienen en cuenta el contenido de G+C del ácido nucleico, la longitud de la sonda de hibridación, etc. (por ejemplo, Sambrook *et*

65

al., 1989). Para maximizar la tasa de hibridación entre la sonda y su diana, las hibridaciones se suelen llevar a cabo en soluciones de elevada fuerza iónica (6x SSC o 6x SSPE) a una temperatura que está aproximadamente 20-25°C por debajo de la T_m. Si las secuencias a hibridar no son idénticas, entonces, la temperatura de hibridación se reduce en 1-1,5 °C por cada 1 % de emparejamiento incorrecto. Por lo general, las condiciones de lavado deben ser tan rigurosas como sea posible (es decir, fuerza iónica baja a una temperatura de aproximadamente 12-20 °C por debajo de la T_m calculada). Como ejemplo, condiciones muy rigurosas suelen implicar la hibridación a 68 °C en 6x SSC/5x de solución de Denhardt/SDS al 1,0 % y lavado en 0,2x SSC/0,1 % SDS a 65 °C. Las condiciones de hibridación óptimas generalmente difieren entre las hibridaciones realizadas en solución y las hibridaciones que utilizan ácidos nucleicos inmovilizados. La persona experta en la materia apreciará qué parámetros se deben manipularse para optimizar la hibridación.

El término "ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos unidos. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, pueden ser nucleótidos convencionales o no convencionales; pueden ser nucleótidos modificados o derivatizados; pueden ser análogos sintéticos. Los nucleótidos pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster o mediante enlaces no hidrolizables. El ácido nucleico puede comprender unos o pocos nucleótidos (es decir, un oligonucleótido), o puede comprender varios nucleótidos (es decir, un polinucleótido). El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario.

El término "pronóstico" tal como se usa en el presente documento se refiere a la evolución probable y al resultado de un cáncer, y en particular, a la posibilidad de recuperación.

Por tanto, se pretende que la invención no esté limitada a la realización concreta descrita en el presente documento contemplada para llevar a cabo la presente invención, sino que dicha invención incluirá todas las realizaciones comprendidas en el alcance de las reivindicaciones.

REFERENCIAS

Las patentes, publicaciones y otros materiales utilizados en el presente documento para desvelar la invención o proporcionar detalles relativos a la práctica de la presente invención se proporcionan en la siguiente bibliografía.

La cita de cualquiera de los documentos a los que se hace referencia en el presente documento no está prevista como una admisión de que cualquiera de los anterior sea técnica anterior pertinente. Todas las declaraciones, tales como la fecha o representación, así como el contenido de estos documentos están basados en la información disponible para el solicitante, y no constituye ninguna admisión de la exactitud de las fechas o el contenido de dichos documentos.

1. Pasquale EB (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:462-475.
2. Easty DJ, Hill SP, Hsu MY, Fallowfield ME, Florenes VA, Herlyn M, Bennett DC (1999) *Int J Cancer* 84:494-501.
3. Vogt T, Stolz W, Welsh J, Jung B, Kerbel RS, Kobayashi H, Landthaler M, McClelland M (1998) *Clin Cancer Res* 4:791-797.
4. Lugli A, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kiefer J, Huusko P, Azorsa D, Terracciano L, Sauter G, Kallioniemi OP, Mousses S, Tornillo L (2005) *Clin Cancer Res* 11:6450-6458.
5. Wu Q, Suo Z, Risberg B, Karlsson MG, Villman K, Nesland JM (2004) *Pathol Oncol Res* 10:26-33.
6. Walker-Daniels J, Coffman K, Azimi M, Rhim JS, Bostwick DG, Snyder P, Kerns BJ, Waters DJ, Kinch MS (1999) *Prostate* 41:275-280.
7. Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS (2001) *Cancer Res* 61:2301-2306.
8. Miyazaki T, Kato H, Fukuchi M, Nakajima M, Kuwano H (2003) *Int J Cancer* 103:657-663.
9. Kittles RA, Baffoe-Bonnie AB, Moses TY, Robbins CM, Ahaghotu C, Huusko P, Pettaway C, Vijayakumar S, Bennett J, Hoke G, *et al.* (2006) *J Med Genet* 43:507-511.
10. Oba SM, Wang YJ, Song JP, Li ZY, Kobayashi K, Tsugane S, Hamada GS, Tanaka M, Sugimura H (2001) *Cancer Lett* 164:97-104.
11. Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E (1992) *Cell* 71:701-708.
12. Johansson B, Moorman AV, Haas OA, Watmore AE, Cheung KL, Swanton S, Secker-Walker LM (1998) European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* 12:779-787.
13. Aasheim HC, Terstappen LW, Logtenberg T (1997) *Blood* 90:3613-3622.
14. Nakamura T, Canaani E, Croce CM (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* en prensa.
15. Thomas M, Gessner A, Vormlocher HP, Hadwiger P, Greil J, Heidenreich O (2005) *Blood* 106:3559-3566.
16. Zeisig BR, Milne T, Garcia-Cuellar M-P, Schreiner S, Martin m-E, Fuchs U, Borkhardt A, Chanda SK, Walker J, Soden R, *et al.* (2004) *Mol Cell Biol* 24:617-628.
17. Yu C, Subler M, Rahmani M, Reese E, Krystal G, Conard D, Dent P, Grant S (2003) *Cancer Biol. Therapy* 2:544-551.
18. Rubinfeld H, Serger R (2005) *Mol Biotech* 31:151-174.
19. Fox T, Coll JT, Xie X, Ford PJ, Germann UA, Porter MD, Pazhanisamy S, Fleming MA, Galullo V, Su MS, Wilson KP (1998) *Protein Sci* 11:2249-2255.

20. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ (2002) *Nat Genet* 30:41-47.
21. Rozovskaia T, Ravid-Amir O, Tillib S, Getz G, Feinstein E, Agrawal H, Nagler A, Rappaport EF, Issaeva I, Matsuo Y, *et al.* (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7853-7858.
- 5 22. Xu C, Robbins D, Frost J, Dang A, Lange-Carter C, Cobb MH (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6808-6812.
23. Grammer TC, Blenis J (1977) *Oncogene* 14:1635-1642. 24. Janis LS, Cassidy RM, Kromer LF (1999) *J Neurosci* 19:4962-4971.
24. Janis LS, Cassidy RM, Kromer LF (1999) *J Neurosci* 19:4962-4971.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar la presencia de proteínas de fusión ALL1 en células en una muestra de un sujeto, en donde el método comprende medir el nivel de la expresión de EphA7 en las células.
5
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las proteínas de fusión ALL1 son proteínas de fusión ALL1/AF4 y ALL1/AF9.
3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el nivel de expresión de EphA7 se mide mediante PCR.
10
4. Un método *in vitro* para reducir la fosforilación de ERK1/2 en células leucémicas que expresan la proteína de fusión ALL1 mediante la supresión de la expresión de EphA7 con un ARNip dirigido contra EphA7.
- 15 5. Un agente que comprende al menos 5-yodotubercidina (5-ITU) para su uso en el tratamiento de la leucemia en donde las células leucémicas tienen la translocación t(4;11).

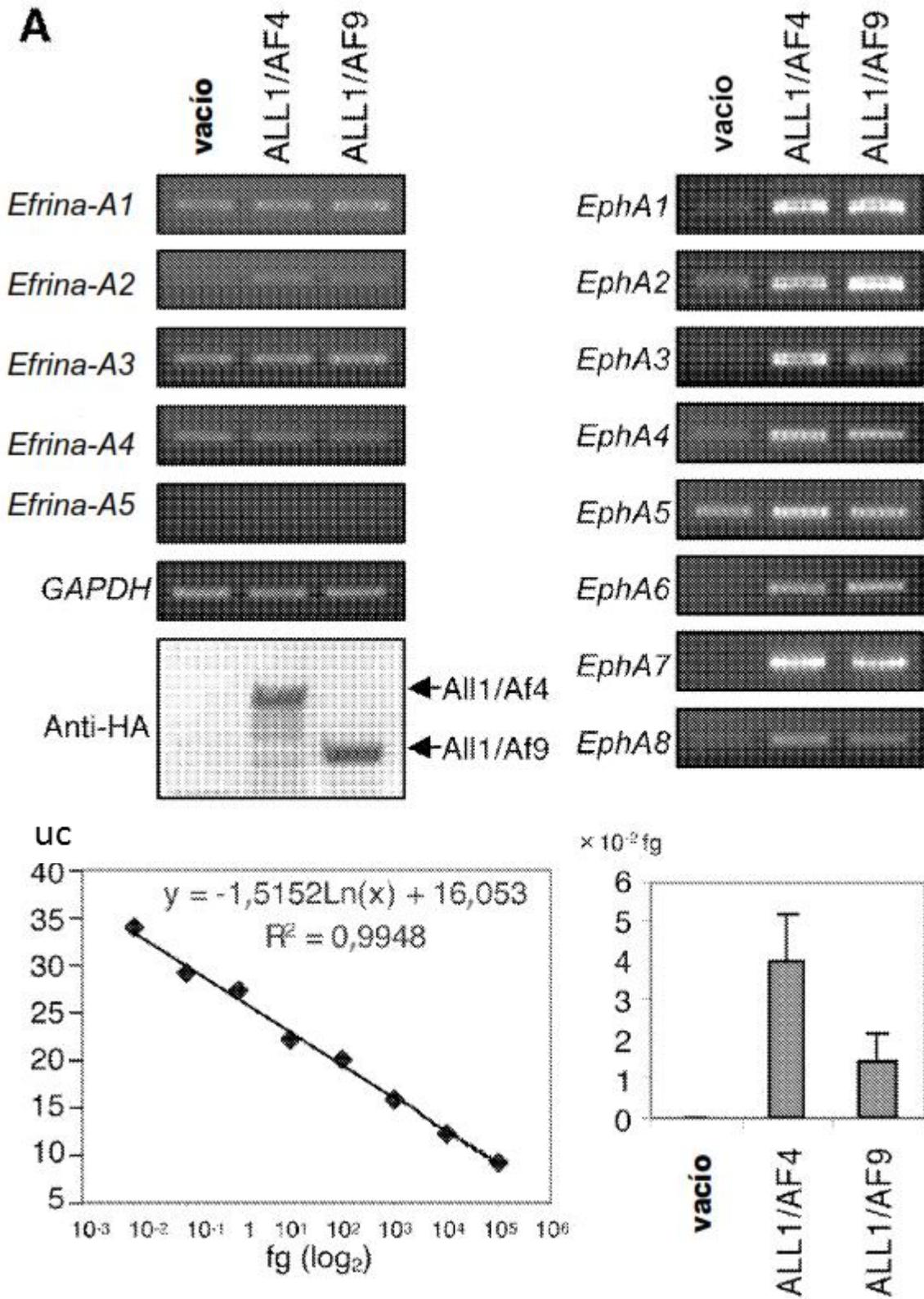


Figura 1A

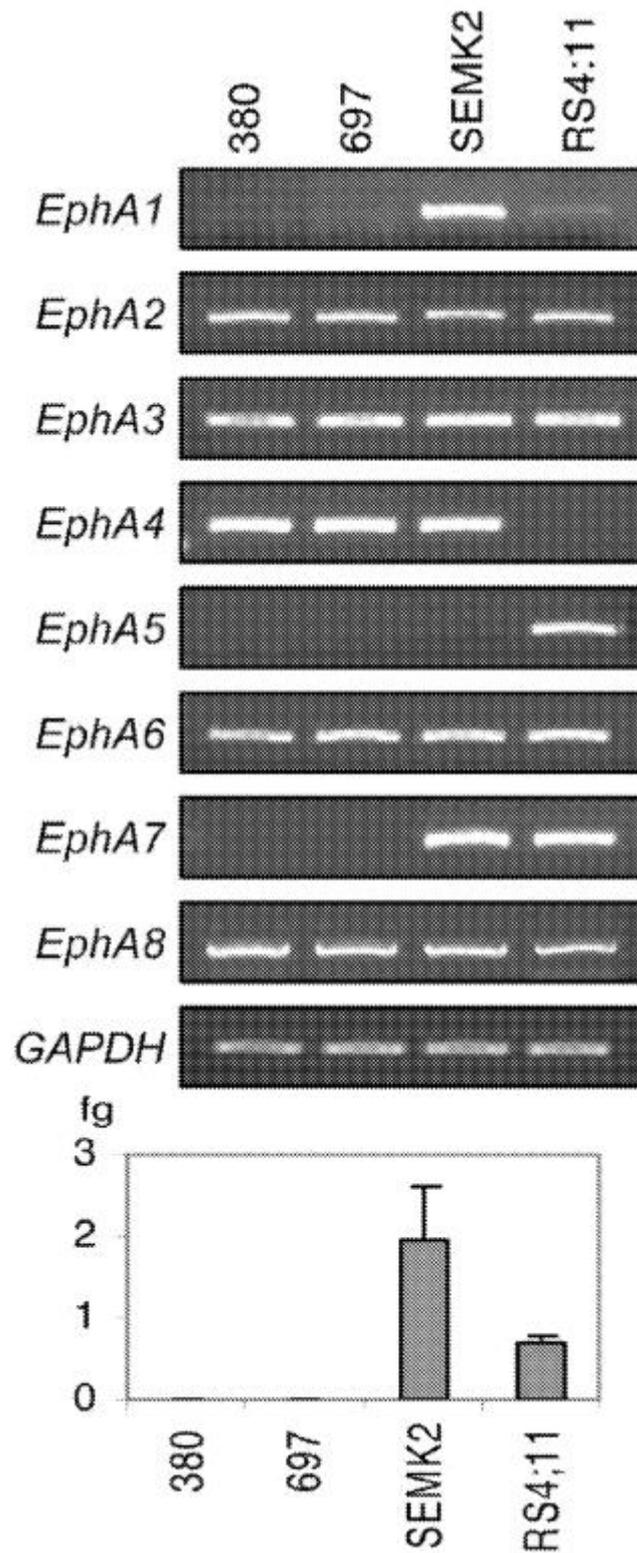


Figura 1B

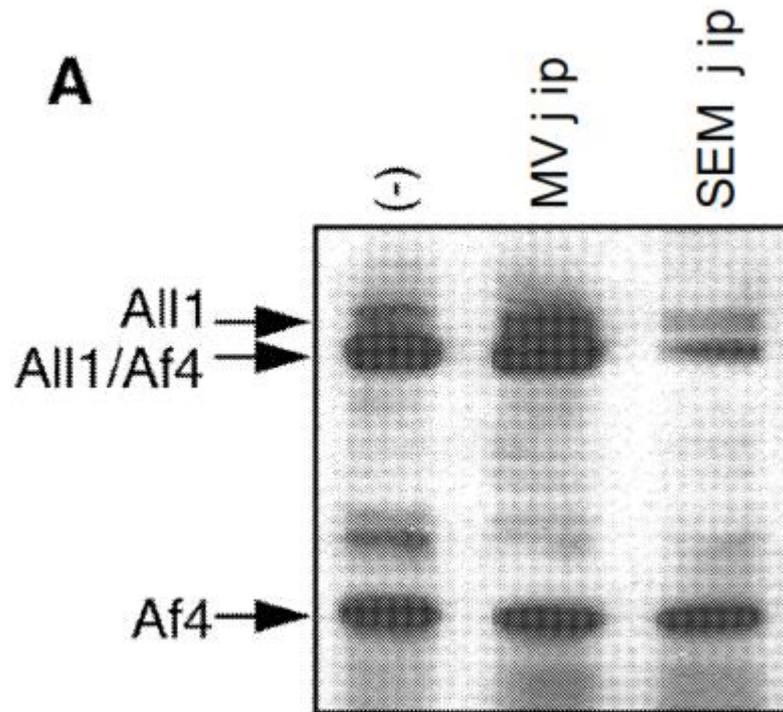


Figura 2A

B

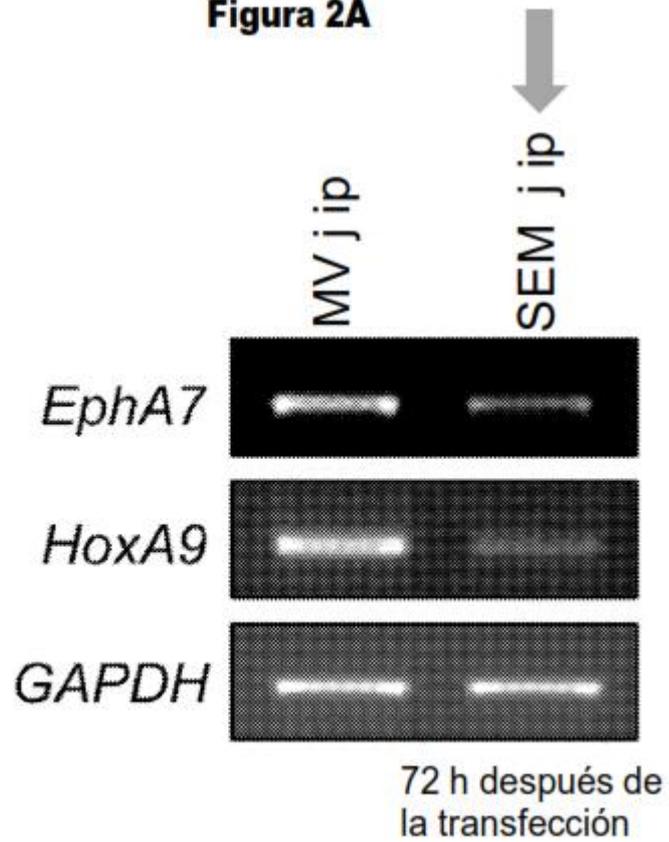


Figura 2B

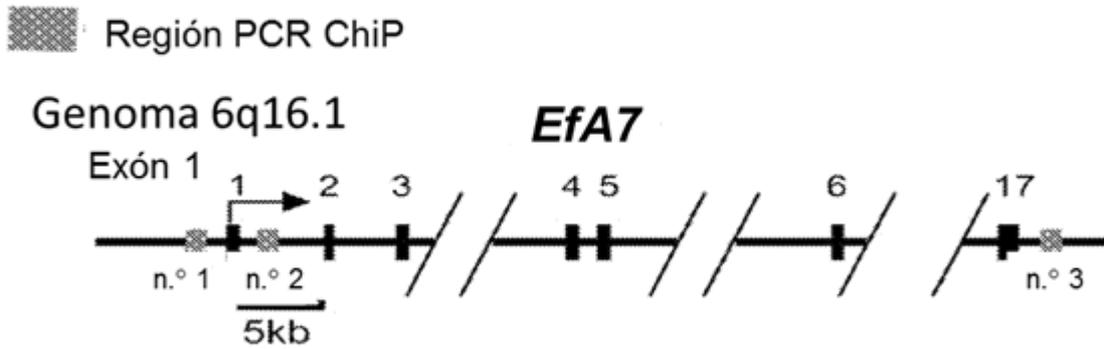


Figura 3A

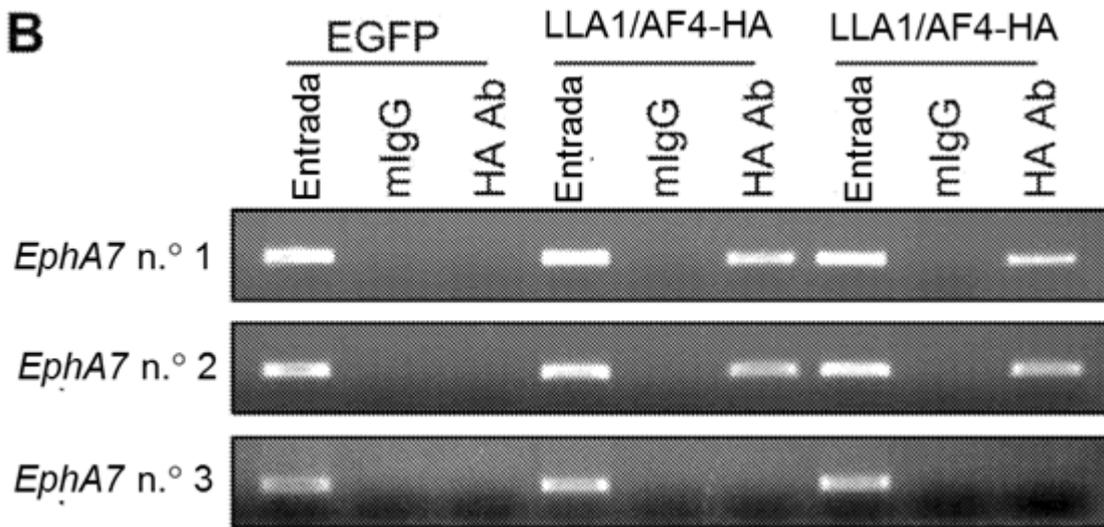


Figura 3B

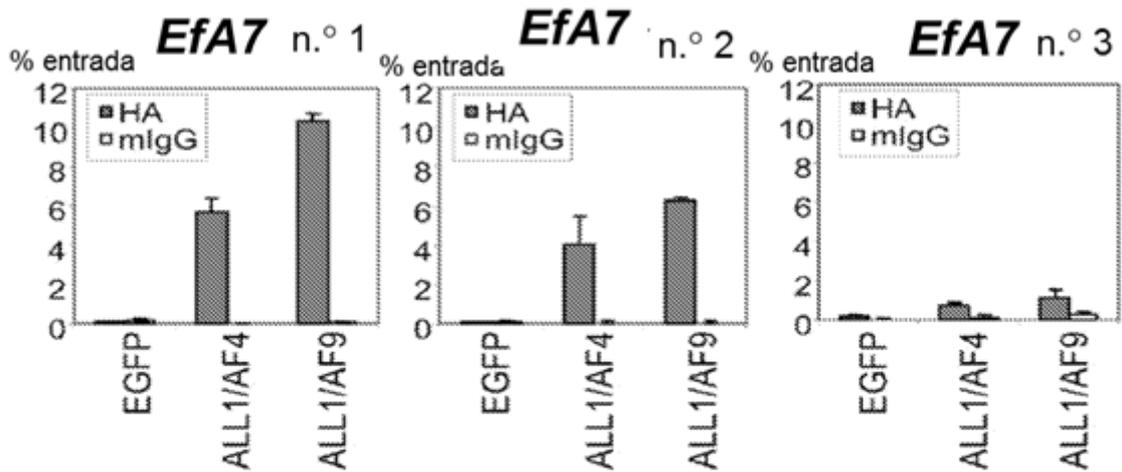


Figura 3C

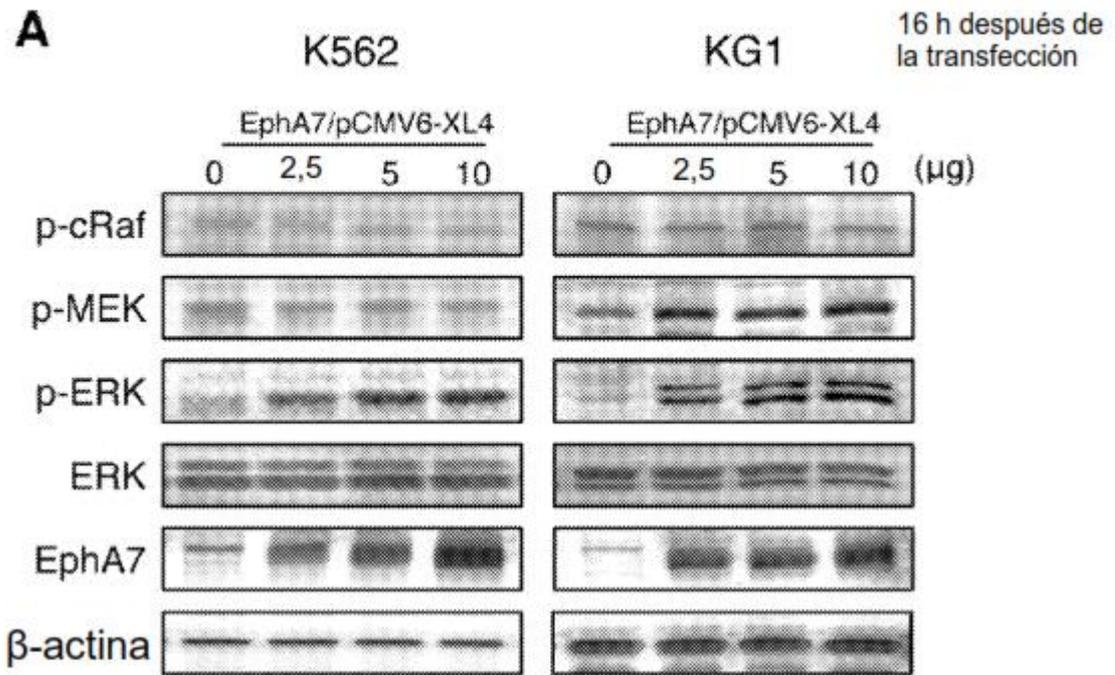


Figura 4A

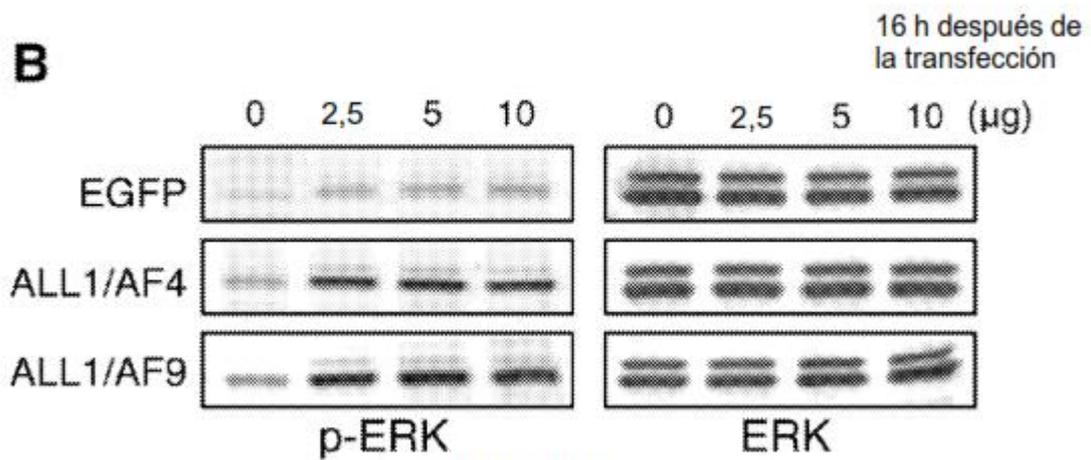


Figura 4B

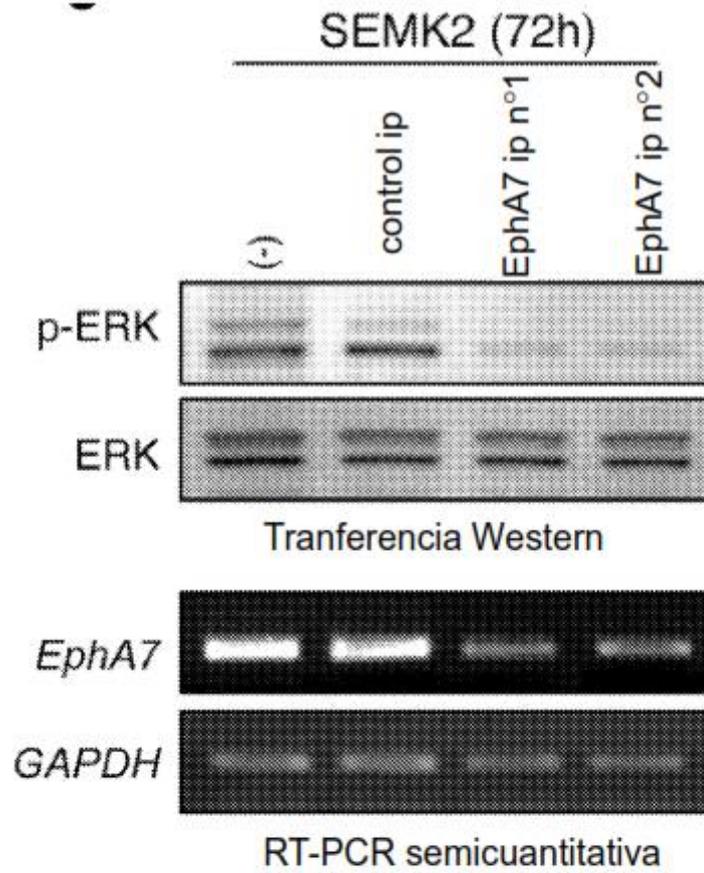


Figura 4C

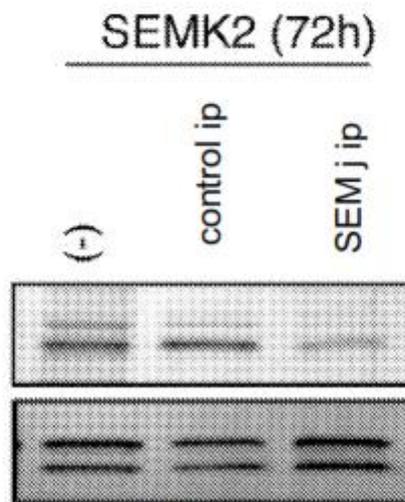


Figura 4D

Ensayo MTT

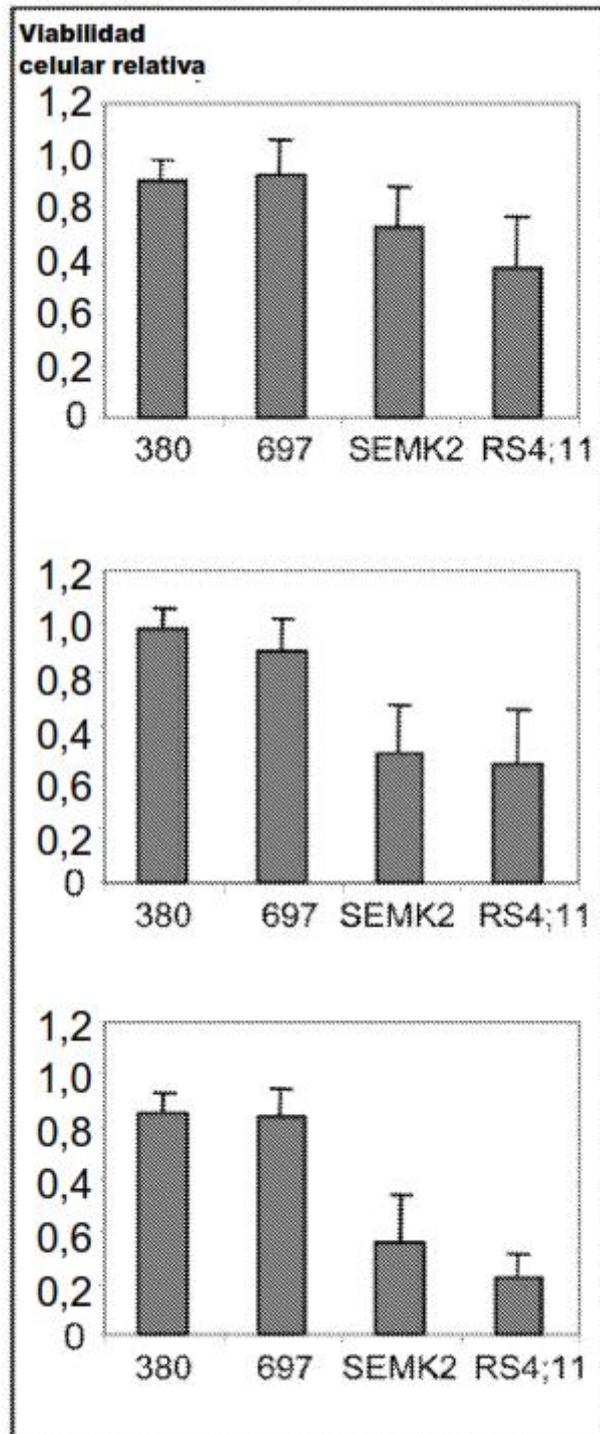


Figura 5A

Actividad de caspasa 3

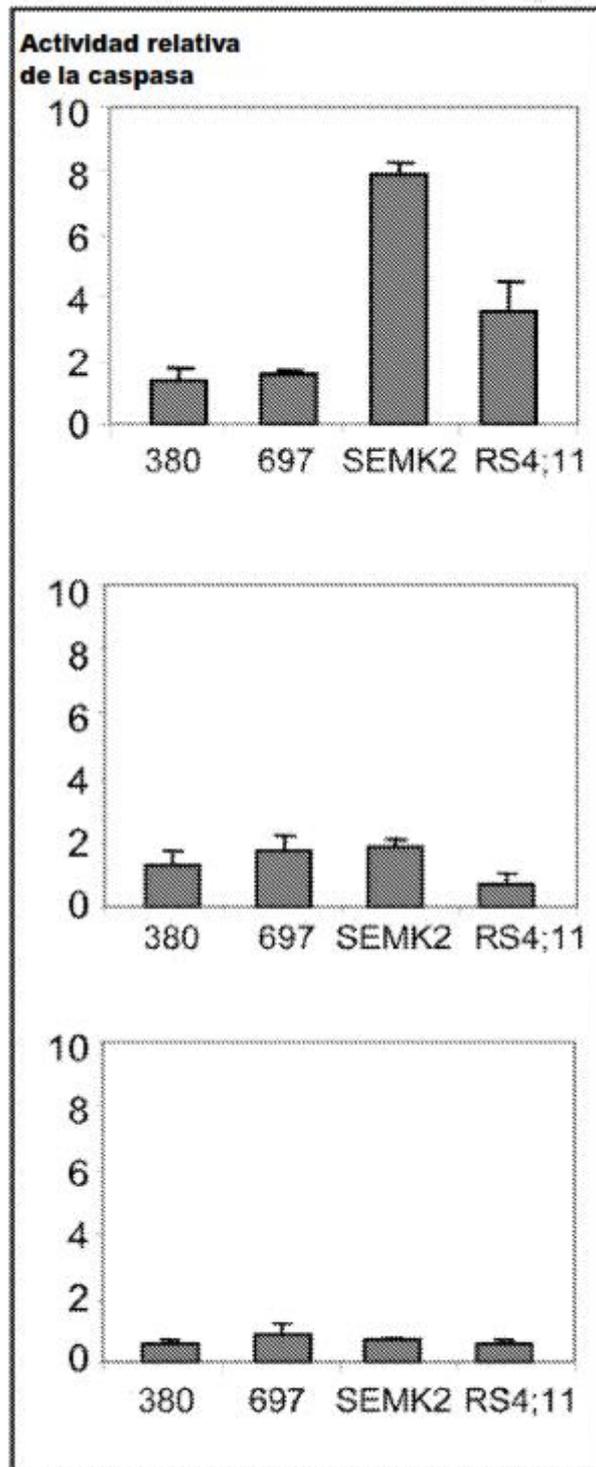
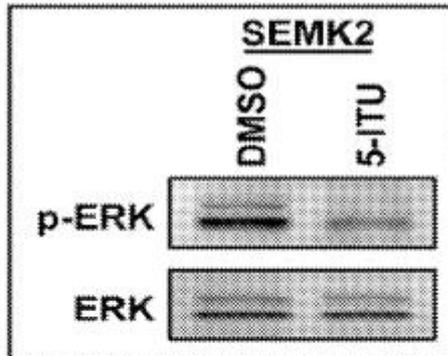
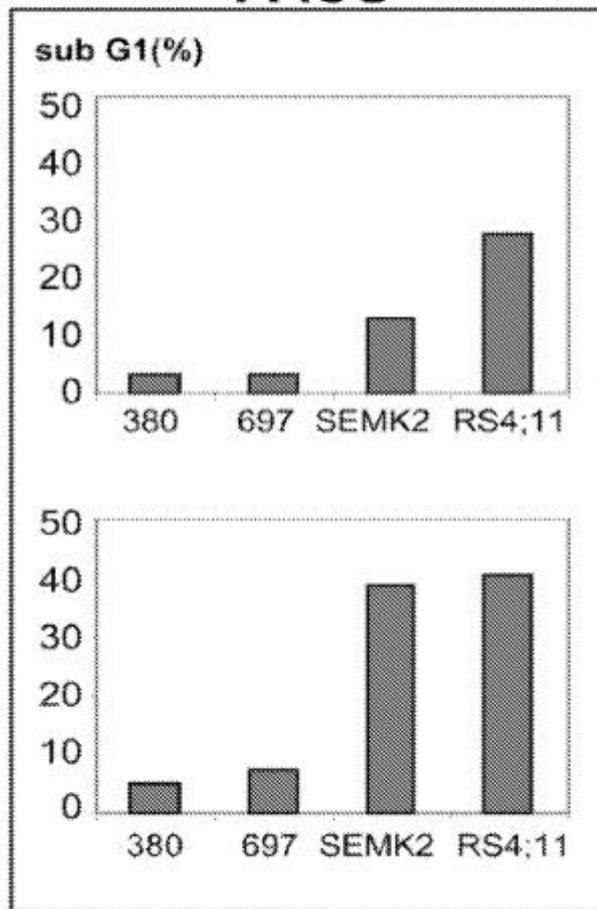


Figura 5B

Transferencia Western



FACS



5-Yodorubicina (1 μM)

Figura 5C