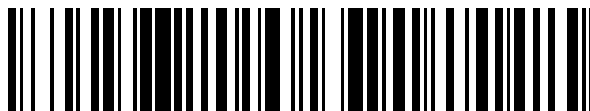


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 596 711**

21) Número de solicitud: 201530997

51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22) Fecha de presentación:

**09.07.2015**

43) Fecha de publicación de la solicitud:

**11.01.2017**

71) Solicitantes:

**FUNDACION PARA LA INVESTIGACION  
BIOMEDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE  
LA PAZ (73.0%)**

**Paseo de la Castellana, 261**

**28046 Madrid ES;**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (10.0%);**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (10.0%)**

**y**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA**

**FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (7.0%)**

72) Inventor/es:

**IBÁÑEZ DE CÁCERES, Inmaculada;**

**PERNÍA ARIAS, Olga;**

**DE CASTRO CARPEÑO, Javier;**

**PERONA ABELLÓN, Rosario;**

**ROJO TODO, Federico;**

**VERA PUENTE, Olga y**

**JIMÉNEZ HERNÁNDEZ, Julia**

74) Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54) Título: **Determinación de la metilación y niveles de un miARN en respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino**

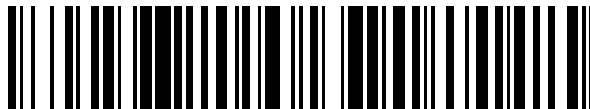
**ES 2 596 711 A1**

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 711**

21 Número de solicitud: 201530997

57 Resumen:

Determinación de la metilación y niveles de un miARN en respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino.

La presente invención se relaciona con un método para determinar la respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino en una paciente de cáncer de ovario que comprende (i) determinar el nivel de metilación en la isla CpG de secuencia SEQ ID NO:1 y (ii) comparar el nivel de metilación en dicha isla CpG en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 con un valor de referencia correspondiente, en donde un incremento en el nivel de metilación obtenido en (i) o una disminución en el nivel de expresión obtenido en (i) con respecto al valor de referencia correspondiente, es indicativo de que el cáncer de ovario de dicha paciente es resistente a dicho compuesto de platino. La invención también se relaciona con el uso de miR-7 o un precursor del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer resistente a un compuesto antitumoral basado en platino.

ES 2 596 711 A1

## DESCRIPCIÓN

Determinación de la metilación y niveles de un miARN en respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente invención está relacionada con un método para determinar la respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino en una paciente de cáncer de ovario y con el tratamiento de cáncer.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 El cáncer de ovario es la enfermedad ginecológica que más muertes provoca en países desarrollados. Con una incidencia de 204.000 casos al año, provoca 125.000 muertes en el mundo. La mortalidad a 5 años ronda el 70-80%, siendo en la mayoría de los casos debida a la progresión y la metástasis del tumor.

- 15 El tipo más común de cáncer de ovario es el epitelial (90%). Entre los tumores epiteliales existen tumores benignos, tumores de bajo potencial maligno o tumores *borderline* y tumores malignos, cuyo pronóstico depende fundamentalmente del grado (I-III) (Ovarian Cancer Detailed Guideline, ACS 2013). El tratamiento quirúrgico y farmacológico adecuado para cada tipo de tumor depende de su extensión y de su riesgo de progresión, al igual que en el resto de tumores; pero en el cáncer de ovario la decisión quirúrgica debe ser lo más conservadora posible, de cara a evitar la pérdida de fertilidad en las pacientes.

- 20 Aunque la mayoría de las pacientes responden al tratamiento farmacológico, muchos pacientes desarrollan resistencia a compuestos antitumorales basado en platino, lo que resulta en un avance rápido de la enfermedad. El mecanismo exacto por el cual las células cancerosas de ovario se vuelven resistentes al tratamiento con cisplatino es actualmente desconocido.

- 25 Los microARNs son ARNs no codificantes de pequeño tamaño (21-22 pares de bases) ocurren de manera natural y reconocen principalmente la región 3' no codificante de ARNm e inhiben la síntesis de proteínas.

- 30 Varios estudios recientes indican que la desregulación de miARNs y sus genes diana promueven la aparición del cáncer, progresión y resistencia a medicamentos. Por estas razones se han intentado identificar la relación de los miARNs con la resistencia al cáncer de ovario.

Es conocido que los niveles de diversos miARNs se encuentran incrementados en cáncer de ovario resistentes a cisplatino, por ejemplo mir-214 (Yang H. et al., Cancer Res. 2008 Jan 15;68(2):425-33), mir-21 (Echevarría-Vargas IE. et al., PLOS May 2014 Volumen 9 Issue 5), y otros cuyos niveles se encuentran reducidos en células de cáncer de ovario resistentes a cisplatino, por ejemplo miR-106a (Rao YM. et al., J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2013 Aug;33(4):567-72).

Sin embargo, la resistencia a platino en cáncer de ovario es un proceso complejo y multifactorial, que implica varios mecanismos y procesos, siendo un reto predecirlo a partir de un perfil de miARNs.

10 Por tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos que permitan determinar la respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino en pacientes con cáncer de ovario y de la identificación de nuevos compuestos para el tratamiento de cánceres resistentes a antitumorales basados en platino.

#### **COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

15 En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar la respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino en una paciente de cáncer de ovario que comprende

(i) determinar el nivel de metilación en la isla CpG de secuencia SEQ ID NO:1 en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 en una muestra de dicha paciente, y

20 (ii) comparar el nivel de metilación en dicha isla CpG en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 con un valor de referencia correspondiente,

en donde un incremento en el nivel de metilación obtenido en (i) o una disminución en el nivel de expresión obtenido en (i) con respecto al valor de referencia correspondiente, es indicativo de que el cáncer de ovario de dicha paciente es resistente a dicho compuesto de platino.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el uso de miR-7 o un precursor del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer resistente a un compuesto antitumoral basado en platino.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Respuesta a cisplatino (CDDP) de las líneas sensibles (S) y resistentes (R) utilizadas en el estudio H460S/R, H23S/R, A2780S/R y OVCAR3S/R.

**Figura 2:** Cuantificaciones de los cambios en expresión de los miARNs en las líneas utilizadas. Todos cambian su expresión en al menos una de las líneas R (resistentes) comparadas con las sensibles (S), utilizadas como calibrador en la gráfica y se recuperan tras reactivación epigenética (RT).

**Figura 3:** Viabilidad celular tras sobreexpresión del precursor del miARN- 7. Esta figura muestra cómo la sobreexpresión del miR-7 en las líneas resistentes H23R y A2780R induce la mortalidad del 50% de las células en cultivo, por lo que su función podría estar estrechamente vinculada con la progresión tumoral. A: Controles de la efectividad de la transfección del precursor del miARN-7 en las células H23R y A2780R. B: Viabilidad celular tras la transfección con el precursor del miARN en las líneas H23R y A2780R.

**Figura 4:** Curvas de Kaplan Meier mostrando el tiempo a la primera progresión (TP) en meses (figura superior) y tiempo de supervivencia global (SG) en meses (figura inferior).

## 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

### Método para determinar la respuesta

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar la respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino en una paciente de cáncer de ovario que comprende

- 20 (i) determinar el nivel de metilación en la isla CpG de secuencia SEQ ID NO: 1 en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 en una muestra de dicha paciente, y
- (ii) comparar el nivel de metilación en dicha isla CpG en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 con un valor de referencia correspondiente,
- 25 en donde un incremento en el nivel de metilación obtenido en (i) o una disminución en el nivel de expresión obtenido en (i) con respecto al valor de referencia correspondiente, es indicativo de que el cáncer de ovario de dicha paciente es resistente a dicho compuesto de platino.

30 La expresión “determinar la respuesta de un paciente” se refiere a la valoración de la respuesta de una terapia antitumoral basado en platino en un paciente que padece cáncer.

“Compuesto antitumoral basado en platino”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a drogas antineoplásicas basadas en platino, comúnmente llamadas platinos y que resultan en la inhibición de la reparación del ADN y/o en la síntesis de ADN, como consecuencia del entrecruzamiento de dichos agentes con el ADN. Ejemplos ilustrativos, no  
5 limitativos de compuestos de platino son cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatino, lipoplatino.

En una realización preferida el compuesto antitumoral basado en platino es cisplatino, también conocido como cis-diaminodicloroplatino (II) o CDDP.

Por “cáncer de ovario”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a un tumor  
10 maligno originado en cualquiera de las partes del ovario. La ubicación más frecuente es el epitelio que recubre al ovario. También se desarrolla a partir de las células germinales o del tejido conectivo alrededor del ovario.

En una realización particular el cáncer de ovario es carcinoma de ovario de origen epitelial.

Por “carcinoma de ovario de origen epitelial”, tal y como se usa en la presente invención, se  
15 refiere a un tipo de cáncer que deriva de la superficie epitelial que recubre la superficie del ovario o del tejido endometrial.

El experto en la materia conoce diversos métodos para determinar si una paciente presenta un cáncer de ovario, entre otros mediante la determinación de marcadores tumorales como CA-125, estudios por imágenes, tomografía computarizada, resonancia magnética o  
20 ecografía entre otros.

El término “paciente”, “sujeto”, “individuo” aplicado a cáncer se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza. En el caso de cáncer de ovario el paciente es de género femenino.

25 En una primera etapa, el método de la invención comprende determinar el nivel de metilación en la isla CpG de secuencia SEQ ID NO:1 en el gen que codifica miR-7 en una muestra de la paciente.

Como se usa en el presente documento, el término “isla CpG” se refiere a una secuencia corta de ADN rica en el dinucleótido CpG y que se puede encontrar en la región 5’ de  
30 aproximadamente la mitad de los genes. Las islas CpG típicamente tienen, pero no siempre, entre aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 1 kb de longitud. “CpG” es la abreviatura de “Citosina-fosfato-Guanina”, es decir, citosina y guanina separadas por sólo

un fosfato; el fosfato enlaza dos nucleósidos cualesquiera juntos en el ADN. El término "CpG" se utiliza para distinguir esta secuencia lineal del apareamiento de bases CG de citosina y guanina. Citosinas en los dinucleótidos CpG pueden estar metiladas para formar 5-metilcitosina.

5

El gen que codifica mir-7 presenta diversas islas CpG. Concretamente, la isla CpG analizada en la invención se encuentra en el precursor mir-7-3 y se encuentra en el cromosoma 19p13.3 posiciones 4769132-4769799, es decir la región entre los nucleótidos 1550 y 883 antes del inicio de la región codificante de miR-7.

10

El término "metilación" como se usa en el presente documento, se refiere a la unión covalente de un grupo metilo en la posición C5 de la base nucleotídica citosina en los dinucleótidos CpG de regiones reguladoras de genes. El término "estado de metilación" o "nivel de metilación" se refiere a la presencia o ausencia de 5-metil-citosina ("5-mCyt") en uno o una pluralidad de dinucleótidos CpG en una secuencia de ADN. Como se usa en el presente documento, los términos "estado de metilación" y "nivel de metilación" se usan de forma intercambiable.

15

El término "miARN", tal como se utiliza en la presente invención, también conocido como "micro ARN", hace referencia a una molécula de ARN monocatenario, normalmente de alrededor de 21-25 nucleótidos de longitud, con capacidad de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante la degradación del mARN o bien mediante la inhibición del proceso de traducción a proteína.

20

"miR-7", tal y como se usa en la presente invención se refiere al miARN maduro derivado de tres precursores miR-7-1, miR-7-2 y miR-7-3 cuyas secuencias en humano corresponden a los números de acceso MI0000263, MI0000264 y MI0000265, respectivamente, de la base de datos de miRBase a fecha 8 de abril de 2015.

25

De acuerdo a la invención, la determinación del nivel de metilación en la isla CpG de SEQ ID NO: 1 del gen que codifica miR-7 se realiza en una muestra de la paciente.

30

El término "muestra" o "muestra biológica", como se usa aquí, se refiere a material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica contiene cualquier material biológico adecuado para detectar el patrón de metilación deseado en uno o más sitio(s) CpG y puede comprender células y/o material no celular del sujeto. En la presente invención, la muestra comprende material genético, p. ej., ADN, ADN genómico (ADNg), ADN complementario

35

(ADNc), ARN, ARN nuclear heterogéneo (ARNhn), ARNm, etc., del sujeto objeto de estudio. En una realización particular, el material genético es ADN. En una realización preferida, el ADN es ADN genómico. En otra realización preferida, el ADN es ADN circulante. La muestra se puede aislar de cualquier tejido o fluido biológico adecuado tal como, por ejemplo sangre, saliva, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), heces, un hisopo bucal o buco-faríngeo, una muestra, una muestra obtenida a partir de una biopsia, y una muestra de tejido incluido en parafina. Métodos para aislar células y muestras de tejidos son bien conocidos para los expertos en la materia. En una realización particular, la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, orina, saliva, suero, plasma, un hisopo bucal o buco-faríngeo, 5  
10  
15  
cabello, una muestra quirúrgica del tumor, y una muestra obtenida a partir de una biopsia. En una realización preferida, la muestra se selecciona de sangre, suero, pelo, plasma, orina y saliva.

En una realización preferida la muestra es una muestra que contiene células tumorales, preferiblemente una muestra del tumor primario, del tejido metastásico o un biofluido.

15  
20  
La expresión “muestra del tumor”, tal como aquí se usa, se refiere a una muestra de tejido procedente del tumor primario del cáncer. “Tumor primario” se refiere a un tumor que tiene su origen en el tejido u órgano en el que se encuentra y que no ha metastatizado a dicha localización desde otra localización. “Tejido metastásico”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un tejido canceroso en un órgano distinto de aquel en que se inició.

La muestra de tejido tumoral se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante biopsia, utilizando métodos bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas relacionadas. Los métodos para obtener una muestra de la biopsia 25  
30  
incluyen partición en trozos grandes de un tumor, o microdissección u otros métodos de separación de células conocidos en la técnica. Las células tumorales se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en formalina y embeber en parafina o congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, tal como compuesto OCT, mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación rápida.

La muestra del tumor se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula, para liberar los componentes intracelulares en una solución acuosa u 35  
orgánica para preparar los ácidos nucleicos para análisis adicionales. Los ácidos nucleicos



se extraen de la muestra mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente.

En aquellos casos en donde la muestra de ADN no está encerrada en una membrana (por ejemplo, ADN circulante de una muestra de sangre), se pueden emplear métodos estándar en la técnica para el aislamiento y/o purificación de ADN. Tales métodos incluyen el uso de un reactivo degenerante de proteínas, por ejemplo, sal caotrópica, por ejemplo clorhidrato de guanidinio o urea; o un detergente, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS), bromuro de cianógeno. Los métodos alternativos incluyen, pero no están limitados a precipitación con etanol o precipitación con propanol, concentración al vacío entre otros por medio de una centrífuga. El experto en la materia también puede hacer uso de dispositivos tales como dispositivos filtros, por ejemplo, ultracentrifugación, superficies o membranas de sílice, partículas magnéticas, partículas de poliestireno, superficies de poliestireno, superficies cargadas positivamente y membranas cargadas positivamente, membranas cargadas, superficies cargadas, membranas cargadas cambiadas, superficies cargadas cambiadas.

Una vez se han extraído los ácidos nucleicos, el ADN bicatenario genómico se usa en el análisis. El análisis de metilación se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido en la técnica. En la técnica se conocen una variedad de procedimientos de análisis de metilación y se pueden usar para practicar la invención. Estos ensayos permiten la determinación del estado de metilación de uno o una pluralidad de sitios CpG en una muestra de tejido. Además, estos métodos se pueden usar para la cuantificación absoluta o relativa de los ácidos nucleicos metilados. Tales ensayos de metilación implican, entre otras técnicas, dos pasos principales. El primer paso es una reacción o separación específica de metilación, tal como (i) tratamiento con bisulfito, (ii) unión específica de metilación, o (iii) enzimas de restricción específicas de metilación. El segundo paso principal implica (i) amplificación y detección, o (ii) detección directa, mediante una variedad de métodos tales como (a) PCR (amplificación específica de secuencia) tal como Taqman®, (b) secuenciación de ADN de ADN sin tratar y tratado con bisulfito, (c) secuenciación mediante ligación de sondas modificadas con colorantes (incluyendo ligación y corte cíclicos), (d) pirosecuenciación, (e) secuenciación de moléculas únicas, (f) espectrometría de masas, o (g) análisis por transferencia de tipo Southern.

Además, se puede usar la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados del ADN convertido con bisulfito, por ejemplo, el método descrito por Sadri y Hornsby (1996, Nucl. Acids Res. 24:5058-5059), o COBRA (Análisis combinado de restricción con bisulfito) (Xiong y Laird, 1997, Nucleic Acids Res. 25:2532- 2534). El análisis

COBRA es un ensayo de metilación cuantitativo útil para determinar los niveles de metilación de ADN en loci de genes específicos en cantidades pequeñas de ADN genómico. Brevemente, se usa la digestión con enzimas de restricción para revelar las diferencias de secuencias dependientes de metilación en productos de PCR de ADN tratado con bisulfito

5 sódico. Las diferencias de secuencia dependientes de metilación se introducen primero en el ADN genómico por tratamiento estándar con bisulfito según el procedimiento descrito por Frommer y col. (Frommer et al, 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 1827-1831). La amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito se realiza después usando cebadores específicos para los sitios CpG de interés, seguido por la digestión con

10 endonucleasas de restricción, electroforesis en gel y detección usando sondas de hibridación marcadas específicas. Los niveles de metilación en la muestra de ADN original están representados por las cantidades relativas de producto de PCR digerido y sin digerir de una manera linealmente cuantitativa a través de un amplio espectro de niveles de metilación de ADN. Además, esta técnica se puede aplicar de forma fidedigna a ADN

15 obtenido de muestras de tejido embebidas en parafina microdisecadas. Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podrían encontrar en un kit basado en COBRA típico) para el análisis COBRA pueden incluir, pero no están limitados a: cebadores de PCR para genes específicos (o secuencia de ADN alterada por metilación o islas CpG); enzimas de restricción y tampón apropiado; oligo de hibridación con genes; oligo de hibridación control;

20 kit de marcaje con quinasa para la sonda de oligo; y nucleótidos radioactivos. Además, los reactivos de conversión con bisulfito pueden incluir: tampón de desnaturalización de ADN; tampón de sulfonación; reactivos o kits de recuperación de ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); tampón de desulfonación; y componentes de recuperación de ADN.

25 En una forma de realización preferida, el nivel de metilación de islas CpG de SEQ ID NO: 1 se determina usando PCR específica de metilación (MSP). MSP permite evaluar el estado de metilación de virtualmente cualquier grupo de sitios CpG en una isla CpG, independiente del uso de enzimas de restricción sensibles a metilación. Brevemente, el ADN se modifica mediante bisulfito sódico que convierte las citosinas sin metilar, pero no las metiladas, a

30 uracilo y posteriormente se amplifica con cebadores específicos para ADN metilado frente a sin metilar. MSP requiere solo cantidades pequeñas de ADN, es sensible al 0,1 por ciento de alelos metilados de un locus de isla CpG determinada, y se puede realizar en ADN extraído de muestras embebidas en parafina. De forma alternativa, se puede usar PCR específica de metilación multiplexada cuantitativa (QM-PCR).

En una forma de realización, el perfil de metilación de sitios CpG seleccionados se determina usando los métodos MethyLight y Heavy Methyl. Los ensayos MethyLight y Heavy Methyl son un ensayo de metilación cuantitativo de alto rendimiento que utiliza tecnología de PCR en tiempo real con fluorescencia (Taq Man®) que no requiere manipulaciones adicionales después del paso de PCR. Brevemente, el proceso MethyLight empieza con una muestra mezcla de ADN genómico que se convierte, en una reacción con bisulfito sódico, a un conjunto mezclado de diferencias de secuencia dependientes de metilación según procedimientos estándar (el proceso del bisulfito convierte residuos de citosina sin metilar a uracilo). Se realiza después PCR con fluorescencia bien en una reacción de PCR “no sesgada” (con cebadores que no solapan con sitios de metilación CpG conocidos) o en una reacción “sesgada” (con cebadores de PCR que solapan con dinucleótidos CpG conocidos). La discriminación de secuencia se puede producir a nivel del proceso de amplificación o a nivel del proceso de detección con fluorescencia, o ambos. El ensayo MethyLight se puede usar como una prueba cuantitativa para patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en donde la discriminación de secuencia se produce a nivel de la hibridación de la sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción de PCR proporciona una amplificación no sesgada en presencia de una sonda fluorescente que solapa con un sitio de metilación putativo particular. Se proporciona un control no sesgado para la cantidad de ADN de entrada mediante una reacción en la que ni los cebadores ni la sonda recubren ningún nucleótido CpG. De forma alternativa, se logra una prueba cualitativa para metilación genómica probando el conjunto de PCR sesgada con oligonucleótidos control que no “cubren” sitios de metilación conocidos (una versión fluorescente de la técnica “MSP”) o con oligonucleótidos que cubren potenciales sitios de metilación.

Las sondas de detección específicas para los sitios metilados y sin metilar con dos fluoróforos diferentes proporcionan una medida cuantitativa simultánea de la metilación. La técnica “Heavy Methyl” empieza con la conversión con bisulfito del ADN. A continuación bloqueantes específicos previenen la amplificación del ADN sin metilar. El ADN genómico metilado no se une a los bloqueantes y sus secuencias se amplificarán. Las secuencias amplificadas se detectan con una sonda específica de metilación.

La técnica Ms-SNuPE es un método cuantitativo para evaluar las diferencias de metilación en sitios CpG específicos basada en el tratamiento con bisulfito del ADN, seguido por extensión de cebador de nucleótido único. Brevemente, el ADN genómico se hace reaccionar con bisulfito sódico para convertir la citosina sin metilar a uracilo al tiempo que deja la 5-metilcitosina sin cambios. Se realiza después la amplificación de la secuencia diana deseada usando cebadores de PCR específicos para ADN convertido con bisulfito, y

el producto resultante se aísla y usa como molde para análisis de metilación en el/los sitio(s) CpG de interés. Se pueden analizar cantidades pequeñas de ADN (por ejemplo, secciones patológicas microdisecadas) y evita la utilización de enzimas de restricción para determinar el estado de metilación en sitios CpG.

5 En otra forma de realización, el estado de metilación de sitios CpG seleccionados se determina usando métodos de detección de metilación basados en unión diferencial. Para la identificación de regiones diferencialmente metiladas, un planteamiento es capturar ADN metilado. Este planteamiento usa una proteína, en la que el dominio de unión a metilo de MBD2 se fusiona al fragmento Fc de un anticuerpo (MBD-FC). Esta proteína de fusión tiene  
 10 varias ventajas sobre anticuerpos específicos de metilación convencionales. La MCB-FC tiene mayor afinidad hacia ADN metilado y se une a ADN bicatenario. Lo más importante las dos proteínas se diferencian en el modo en que unen ADN. Los anticuerpos específicos de metilación se unen al ADN estocásticamente, lo que significa que solo se puede obtener una respuesta binaria. El dominio de unión a metilo de MBD-FC, por otra parte, se une a  
 15 moléculas de ADN independientemente de su estado de metilación. La fuerza de esta interacción proteína-ADN se define por el nivel de metilación de ADN. Después de unirse a ADN genómico, se pueden usar soluciones eluato de concentraciones de sal crecientes para fraccionar ADN metilado y sin metilar lo que permite una separación más controlada. Por consiguiente, este método, llamado inmunoprecipitación de metil-CpG (MCIP), no solo  
 20 enriquece, sino que también fracciona el ADN genómico según el nivel de metilación, lo que es particularmente positivo cuando la fracción de ADN sin metilar también se debe investigar.

De forma alternativa, se pueden usar anticuerpos contra 5-metilcitosina para unir y precipitar ADN metilado. Los anticuerpos están disponibles en Abcam (Cambridge, MA), Diagenode  
 25 (Sparta, NJ) o Eurogentec (c/o AnaSpec, Fremont, 30 CA). Una vez separados los fragmentos metilados, se pueden secuenciar usando técnicas basadas en micromatrices tal como el ensayo de recuperación de islas CpG metiladas (MIRA) o inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP) u otras técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS). Otra técnica es la de la columna de dominio de unión a metil-CpG/segregación de moléculas  
 30 parcialmente fundidas (MBD/SPM).

Alternativamente, hay enzimas sensibles a metilo que preferente o sustancialmente cortan o digieren en su secuencia de reconocimiento de ADN si no está metilada. Por tanto, una muestra de ADN sin metilar se cortará en fragmentos más pequeños que una muestra de ADN metilado. De forma similar, una muestra de ADN hipermetilado no se cortará. En

cambio, hay enzimas sensibles a metilo que cortan en su secuencia de reconocimiento de ADN solo si está metilada. Las enzimas sensibles a metilo que digieren ADN sin metilar adecuadas para su uso en los métodos de la tecnología incluyen, pero no están limitadas a, HpaII, HhaI, MaeII, BstUI y AclI. Una enzima que se puede usar es HpaII que corta solo la  
5 secuencia CCGG sin metilar. Otra enzima que se puede usar es HhaI que corta solo la secuencia GCGC sin metilar. Ambas enzimas están disponibles de New England BioLabs®, Inc. También se pueden usar combinaciones de dos o más enzimas sensibles a metilo que digieren solo ADN sin metilar. Los métodos y procedimientos de corte para las enzimas de restricción seleccionadas para cortar ADN en sitios específicos los conoce bien el experto en  
10 la materia. Por ejemplo, muchos suministradores de enzimas de restricción proporcionan información sobre las condiciones y tipos de secuencias de ADN cortadas por enzimas de restricción 5 específicas, incluyendo New England BioLabs, Pro-Mega Biochems, Boehringer-Mannheim, y similares.

La técnica MCA es un método que se puede usar para cribar patrones de metilación alterados en ADN genómico, y para aislar secuencias específicas asociadas con estos  
15 cambios. Brevemente, se usan enzimas de restricción con diferentes sensibilidades a metilación en citosina en sus sitios de reconocimiento para digerir ADN genómico de tumores primarios, líneas celulares y tejidos normales antes de amplificación por PCR con cebadores arbitrarios. Los fragmentos que muestran metilación diferencial se clonan y  
20 secuencian después de resolver los productos de PCR en geles de poliacrilamida de alta resolución. Los fragmentos clonados se usan después como sondas para análisis de tipo Southern para confirmar la metilación diferencial de estas regiones. Los reactivos típicos (por ejemplo, como se podrían encontrar en un kit basado en MCA típico) para análisis MCA pueden incluir, pero no están limitados a: cebadores de PCR para cebado arbitrario de ADN  
25 genómico; tampones y nucleótidos de PCR, enzimas de restricción y tampones apropiados; oligos o sondas de hibridación de genes; oligos o sondas para hibridación control.

En otra forma de realización, el estado de metilación de sitios CpG seleccionados se determina usando fusión de alta resolución sensible a metilación (HRM). Una variedad de máquinas de PCR a tiempo real disponibles comercialmente tienen sistemas HRM  
30 incluyendo Roche LightCycler480, Corbett Research RotorGene6000 y Applied Biosystems 7500. También se puede combinar HRM con otras técnicas de amplificación tal como pirosecuenciación.

En otra forma de realización, el estado de metilación del locus CpG seleccionado se determina usando un ensayo de extensión de cebador, incluyendo una reacción de

amplificación por PCR optimizada que produce dianas amplificadas para análisis usando espectrometría de masas. El ensayo también se puede hacer en multiplex. La espectrometría de masas es un método particularmente eficaz para la detección de polinucleótidos asociados con los elementos reguladores diferencialmente metilados. La presencia de la secuencia polinucleotídica se verifica comparando la masa de la señal detectada con la masa esperada del polinucleótido de interés. La fuerza relativa de la señal, por ejemplo, pico de masa en un espectro, para una secuencia polinucleotídica particular indica la población relativa de un alelo específico, lo que permite, por tanto, calcular la relación del alelo directamente a partir de los datos. Para el análisis de metilación se puede adoptar el ensayo para que detecte cambios de secuencia C a T dependientes de metilación introducidos con bisulfito. Estos métodos son particularmente útiles para realizar reacciones de amplificación multiplexadas y reacciones de extensión de cebadores multiplexadas (por ejemplo, ensayos de extensión de masa de cebador homogénea multiplexada (hME)) en un único pocillo para aumentar adicionalmente el rendimiento y reducir el coste por reacción para reacciones de extensión de cebador.

Otros métodos para el análisis de metilación de ADN incluyen barrido genómico de marcas de restricción, análisis de diferencias representativas sensibles a metilación (MS-RDA), las técnicas de matrices de alto rendimiento comprensivas para metilación relativa (CHARM). Las micromatrices de Roche® NimbleGen® incluyen inmunoprecipitación de cromatina en chip (ChIP-chip) o inmunoprecipitación de ADN metilado en chip (MeDIP-chip).

Después de la reacción o separación del ácido nucleico de una manera específica de metilación, el ácido nucleico se puede someter a análisis basado en secuencia.

Alternativamente el método de la invención comprende en una primera etapa determinar el nivel de expresión de miR-7 en una muestra de dicha paciente.

El término “nivel de expresión”, tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia al nivel de expresión de miARN, en particular miR-7. Los niveles de expresión de miR-7 se determinan en una muestra del sujeto.

Para la determinación del nivel de expresión de miR-7, es necesario obtener ARN a partir de la muestra del sujeto afectado de cáncer de ovario que se desea analizar. Técnicas para la purificación de ARN a partir de una muestra de un sujeto son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Se puede purificar ARN total a partir de una muestra mediante homogenización en presencia de un tampón de extracción de ácidos nucleicos, seguido de centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan y el ADN se elimina mediante tratamiento

con DNAasa y precipitación. Se pueden aislar ácidos nucleicos, específicamente ARN y específicamente miARN mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Hay dos métodos principales para aislar ARN: (i) extracción basada en fenol y (ii) unión a matriz de sílice o filtro de fibra de vidrio (GFF). Los reactivos a base de fenol contienen una combinación de desnaturalizantes e inhibidores de RNAasa para la ruptura de células y tejidos y la posterior separación del ARN de contaminantes. Los procedimientos de aislamiento a base de fenol pueden recuperar especies de ARN en el intervalo de 10-200 nucleótidos por ejemplo, miARN, ARN ribosómico (rARN) y ARN nuclear pequeño (snARN). Si una muestra de ARN total se purificó mediante el procedimiento de GFF o columna de matriz de sílice convencional, puede que se hayan perdido los ARN de pequeño tamaño. Sin embargo, los procedimientos de extracción tales como los que usan Trizol o TriReagent purificarán todos los ARN, grandes y pequeños, y son los métodos recomendados para aislar el ARN total de muestras biológicas que contendrán miARN. Cualquier método requerido para el tratamiento de una muestra antes de la cuantificación del nivel de expresión de miR-7 se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Del mismo modo, también se contempla el uso de kits comerciales para la purificación de RNA, en particular de miARN, incluidos, sin limitación, miRNeasy Mini kit de Qiagen, miARN isolation kits de Life Technologies, mirPremier microRNA isolation kit de Sigma-Aldrich y High Pure miARN isolation kit de Roche, en particular kits comerciales para la purificación de RNA, en particular miARN, sin limitación, PAXgene blood miARN kit de Qiagen.

Una vez se dispone de una preparación de ARN a partir de una muestra que se desea analizar, el método de la invención requiere determinar los niveles de expresión de mir-7 en el ARN aislado a partir de dicha muestra. Métodos para determinar los niveles de expresión de miARN en células o muestras biológicas incluyen métodos genéricos para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos, especialmente ARN, métodos optimizados para la detección y cuantificación de especies de ARN pequeñas, puesto que tanto miARN maduros como precursores caen dentro de esta categoría, así como métodos especialmente diseñados para la detección y cuantificación de miARN. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de métodos que pueden ser empleados para determinar los niveles de uno o varios miARN incluyen métodos basados en hibridación, como análisis por Northern blot e hibridación *in situ*, RT-PCR en tiempo real multiplex y/o singleplex (reactivos disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems y System Biosciences (SBI)), incluyendo PCR con transcriptasa inversa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), detección de moléculas individuales, métodos de citometría de flujo a base de perlas, y ensayos que usan matrices de ácidos nucleicos.

Mientras que todas las técnicas de determinación del perfil de expresión génica (RT-PCR, SAGE -Serial Analysis of Gene Expression, o análisis en serie de la expresión génica-, microarrays de expresión o TaqMan) son adecuadas en la presente invención, los niveles de expresión de ARN se determinan con frecuencia mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En una forma de realización particular, los niveles de expresión se determinan mediante PCR cuantitativa, preferiblemente PCR a tiempo real. La detección se puede llevar a cabo en muestras individuales o en micromatrices de tejidos.

En una realización particular, el nivel de expresión de mirR-7 se determina mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) en tiempo real, una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usada para medir rápidamente la cantidad de un producto de PCR. Esto se realiza preferiblemente en tiempo real, por tanto es un método indirecto para medir de manera cuantitativa cantidades de partida de ADN, ADN complementario o ARN. Esto se usa comúnmente para el fin de determinar si una secuencia genética está presente o no, y si está presente el número de copias en la muestra. Como otras formas de PCR, el procedimiento se basa en la amplificación de muestras de ADN, usando ciclos térmicos y una ADN polimerasa termoestable. Los tres métodos de PCR cuantitativa usados comúnmente son: mediante electroforesis en gel de agarosa, mediante el uso de SYBR Green (un colorante de ADN bicatenario) y mediante una sonda de indicador fluorescente. Los dos últimos métodos pueden analizarse en tiempo real, constituyendo por lo tanto métodos de PCR en tiempo real.

El método de sonda de indicador fluorescente es el más preciso y el más fiable de los métodos. Usa una sonda a base de ácidos nucleicos específica de secuencia, de manera que sólo cuantifica la secuencia que hibrida con la sonda y no todo el ADN bicatenario. Dicha sonda, que posee en su extremo 3' un fluoróforo y en su extremo 5' una molécula que bloquea su emisión de fluorescencia (apagador o "quencher"), hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR con la sonda más el par de cebadores específicos, la sonda hibrida en el amplicón pero, debido a la cercanía del fluoróforo al apagador, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa empieza a sintetizar la cadena complementaria para el ADN de molde monocatenario cebado, a medida que la polimerización avanza, alcanza la sonda unida a su secuencia complementaria, de forma que la polimerasa hidroliza la sonda mediante su actividad exonucleasa 5'-3', separando de ese modo el indicador fluorescente y el apagador. Esto da como resultado un aumento en la fluorescencia que se detecta. Durante los ciclos térmicos de la reacción de PCR en tiempo real, se monitoriza el aumento de la fluorescencia a



medida que se libera de la sonda doblemente marcada hidrolizada en cada ciclo de PCR, lo que permite la determinación precisa de las cantidades de ADN finales, y también iniciales.

Cualquier método de PCR que permita determinar la expresión de miR-7 se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

5 Para la determinación del nivel de expresión por PCR es necesario el empleo de sondas. Una sonda es un oligonucleótido de secuencia definida capaz de hibridar de forma específica con una secuencia complementaria de un ácido nucleico, por lo que puede utilizarse para detectar e identificar secuencias complementarias o sustancialmente complementarias en ácidos nucleicos. La longitud de la sonda de la invención puede variar  
10 dentro de un amplio intervalo aunque, por razones prácticas, se prefieren sondas de longitud pequeña menos 10 nucleótidos, preferiblemente al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 20 nucleótidos, preferiblemente al menos 25 nucleótidos y, preferiblemente no más de 100 nucleótidos, más preferiblemente comprendida entre 15 bases y 30 bases, preferiblemente entre 16 bases y 22 bases.

15 Alternativa o adicionalmente, los oligonucleótidos empleados pueden contener enlaces modificados tales como enlaces tipo fosfodiéster, fosfotriéster, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoamidato, metilfosfonato, boranofosfonato, así como combinaciones de los mismos o bien son péptidos ácidos nucleicos (peptide nucleic acids, PNA), en los que los distintos nucleótidos están unidos por  
20 enlaces amida.

El empleo de sondas de mayor o menor longitud no afectaría a la sensibilidad o especificidad de la técnica, pero podría precisar de la realización de una serie de modificaciones de las condiciones sobre las que se realiza la misma al variar la temperatura de fusión de las mismas y su contenido en GC, lo cual afectaría a la temperatura y tiempo  
25 de hibridación fundamentalmente.

Se pueden cuantificar los niveles de expresión de miR-7 mediante comparación con un estándar interno, por ejemplo, el nivel de ARN mensajero de un gen de mantenimiento o “housekeeping” presente en la misma muestra, a modo de gen de control o gen normalizador. Preferiblemente, el gen normalizador es un gen cuyo nivel de expresión no  
30 cambia en una célula, tal como un gen de mantenimiento que codifica una proteína que se expresa se forma constitutiva y que lleva a cabo funciones celulares esenciales. Genes de mantenimiento adecuados para su uso como estándares internos incluyen, aunque no se limitan a, miosina,  $\beta$ -2-microglobulina, ubiquitina, proteína ribosómica de 18S, ciclofilina,

gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y actina. Alternativamente, puede tomarse como normalizador un ARN incluyendo, sin limitación, el snRNA U6 o el snRNA RNU48.

5 El método de la invención requiere, en una segunda etapa, comparar el nivel de metilación en la isla CpG de secuencia SEQ ID NO: 1 en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 obtenido en una muestra de un sujeto con el valor de referencia correspondiente.

10 El término "valor de referencia", tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia a un valor obtenido en el laboratorio y utilizado como referencia para los valores o datos obtenidos mediante exámenes de laboratorio de los pacientes o muestras recogidas de pacientes. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, un intervalo de valores, un valor medio, un valor de la mediana, o un valor en comparación a un control determinado o valor de referencia. El valor de referencia puede estar basado en un valor de la muestra individual, como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que está siendo probada, pero en un momento anterior. El valor de referencia puede estar basado en un gran número de muestras, como los valores de la población de sujetos del mismo grupo de edad, o puede estar basado en un conjunto de muestras, incluyendo o excluyendo la muestra a ensayar.

20 El valor de referencia correspondiente a un miR-7 de acuerdo a la presente invención es un valor de expresión de dicho miARN. El valor de referencia de expresión de un miARN de acuerdo a la invención puede determinarse mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, aislando ARN de cada muestra de la colección, determinando los niveles de expresión de dicho miARN en cada ARN aislado y calculando la media de los niveles de expresión de dicho miARN en cada muestra. Alternativamente, el valor de referencia podría determinarse midiendo los niveles de expresión del miARN en una muestra de ARN obtenida mezclando cantidades iguales de ARN de cada una de las muestras de la colección anteriormente mencionada. La colección de muestras que va a ser analizada para calcular el valor de referencia deriva preferiblemente de una población de 25 dos o más sujetos; por ejemplo, la población puede comprender 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 30 50 o más sujetos.

En una realización particular el valor de referencia corresponde al valor obtenido en una muestra localizada a una distancia del tejido tumoral, a modo de ejemplo ilustrativo en al menos 3 cm del tejido tumoral.

En otra realización particular el valor de referencia se obtiene en una muestra de un sujeto que padece cáncer de ovario sensible a un compuesto de platino, preferiblemente una muestra del tumor primario. En otra realización particular el valor de referencia se obtiene en una muestra de un sujeto sano que no presenta cáncer.

- 5 Por último el método de la invención comprende correlacionar una variación en el nivel de metilación en la isla CpG de secuencia SEQ ID NO:1 en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 obtenido con la respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino. En particular, un aumento en el nivel de metilación obtenido en la etapa (i) o una  
10 disminución en el nivel de expresión obtenido en la etapa (i) del método de la invención, es indicativo que el cáncer de ovario de dicha paciente es resistente a dicho compuesto de platino.

De acuerdo a la presente invención, un incremento en el nivel de metilación se refiere a un incremento del número de moléculas que presentan metilación en una determinada región CpG, lo que resulta en un aumento de la media de moléculas metiladas en una posición  
15 determinada.

De acuerdo con la presente invención, el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG está aumentado cuando el nivel de metilación de dichos uno o más sitio(s) CpG en una muestra es mayor que en la muestra de referencia. El nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG se considera que es mayor que en la muestra de referencia cuando está al menos 1,5%, al  
20 menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15% , al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65% , al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130% , al menos 140%, al menos 150% o más elevado que en la muestra de referencia.

25 Del mismo modo, en el contexto de la presente invención, el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG está disminuido cuando el nivel de metilación de dicho uno o más sitio(s) CpG en una muestra es inferior a un valor de referencia. El nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG se considera que es menor que en la muestra de referencia cuando es al  
30 menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75% , al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150% o más inferior a la de la muestra de referencia.

En el contexto de la presente invención, la expresión “nivel de expresión disminuido con respecto a un valor de referencia”, se refiere a cualquier variación estadísticamente significativa del nivel de expresión de un miARN por debajo de su correspondiente nivel de referencia, en particular a cualquier variación del nivel de expresión de miR-7 por debajo de su correspondiente nivel de referencia. Una variación del nivel de expresión de miR-7, por debajo del valor de referencia puede ser de al menos 0,95 veces, 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos comparado con el correspondiente valor de expresión de referencia.

5

10 La expresión “nivel de expresión aumentado con respecto a un valor de referencia”, se refiere a cualquier variación estadísticamente significativa del nivel de expresión de un miARN por encima de su correspondiente nivel de referencia, en particular a cualquier variación del nivel de expresión de miR-7 por encima de su correspondiente nivel de referencia, y/o cualquier variación del nivel de expresión de miR-7 por encima de su correspondiente nivel de referencia. Una variación del nivel de expresión de un miR-7, por encima de su correspondiente valor de referencia puede ser de al menos 1,05 veces, 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más comparado con el correspondiente valor de expresión de referencia.

15

## 20 Usos médicos

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de miR-7 o un precursor del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer resistente a un compuesto antitumoral basado en platino.

25

Alternativamente, la invención se relaciona con miR-7 o un precursor del mismo para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer resistente un compuesto antitumoral basado en platino.

Alternativamente, la invención se relaciona con un método de tratamiento de un cáncer resistente a un un compuesto antitumoral basado en platino en un sujeto mediante la administración de miR-7 o un precursor del mismo.

30

Los términos miR-7, sujeto, y compuesto antitumoral basado en platino han sido descritos anteriormente y son igualmente aplicables a este aspecto.

El término “tratamiento”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tenga como objetivo la terminación, mejora o reducción de la susceptibilidad a padecer una condición clínica, como se describe aquí. Así, “tratamiento”, “tratar”, y sus términos equivalentes se refieren a la obtención de un efecto deseado farmacológica o fisiológicamente, que cubre cualquier tratamiento de una afección patológica o trastorno en un mamífero, incluyendo el ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de proporcionar prevención total o parcial de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al mismo. Es decir, “tratamiento” incluye (1) inhibir la enfermedad, por ejemplo deteniendo su desarrollo, (2) interrumpir o finalizar el desorden o por lo menos los síntomas asociados al mismo, por lo que el paciente ya no sufriría la enfermedad o sus síntomas, por ejemplo provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas mediante la restauración o reparación de una función perdida, ausente o defectuosa, o estimular un proceso ineficiente, o (3), aminorar, aliviar o mejorar la enfermedad, o los síntomas asociados a la misma, donde aminorar se utiliza en un sentido amplio para referirse a, al menos, una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor, o deficiencia inmune.

En una realización particular, el sujeto que padece cáncer resistente a un compuesto de platino tratado miR-7 o un precursor del mismo, no es tratado con un compuesto de platino.

Dentro del contexto de la presente invención, el término “cáncer” incluye cualquier tipo de cáncer o tumor. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos cánceres o tumores incluyen cánceres hematológicos (e.g., leucemias o linfomas), tumores neurológicos (e.g., astrocitomas o glioblastomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales (e.g., cáncer de estómago, páncreas o colorrectal (CCR)), cáncer de hígado (e.g., carcinoma hepatocelular), cáncer de células renales, tumores genitourinarios (e.g., cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de próstata), tumores óseos, tumores vasculares, etc.

En una realización particular, dicho cáncer es cáncer de ovario, pulmón, colon y páncreas.

Más particularmente, el cáncer de ovario es carcinoma de ovario de origen epitelial y el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

En una realización preferida el compuesto antitumoral basado en platino es cisplatino.

El experto conoce diversos métodos para conocer si el cáncer a tratar según la presente invención es resistente a un compuesto antitumoral basado en platino.

Los microARN (miARN) se producen a partir de un microARN precursor (pre-miARN), que a su vez se forma a partir de un transcrito de microARN primario (pri-miARN).

Por tanto, por “precursor de miR-7” según se usa en la presente invención se incluyen tanto pre-miR-7 como pri-miR-7. En una realización particular el precursor de miR-7 se selecciona  
5 de miR-7-1, miR-7-2 y miR-7-3.

La invención contempla la administración de uno o más precursores de miR-7 solos o en combinación con miR-7.

La invención se refiere tanto a la administración de miR-7 como tal o sus precursores como a la administración de un polinucleótido que comprenda la secuencia que codifica para miR-  
10 7 o un precursor del mismo.

Por tanto, en otra realización miR-7 o un precursor del mismo se administra mediante un polinucleótido que comprende la secuencia que codifica para miR-7 o un precursor del mismo.

La expresión “secuencia que codifica para miR-7 o un precursor del mismo” es un  
15 polinucleótido que comprende la secuencia que codifica para la secuencia pri-miARN, pre-miARN para miR-7 o la secuencia madura miR-7. El polinucleótido que comprende la secuencia madura, pre-miARN, o pri-miARN puede ser monocatenario o bicatenario. Los polinucleótidos pueden contener una o más modificaciones químicas, tales como ácidos nucleicos bloqueados, ácidos nucleicos peptídicos, modificaciones con azúcar, tales como  
20 2'-O-alquilo (por ejemplo, modificaciones 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo), 2'-fluoro, y 4'-tio, y modificaciones de la estructura principal, tales como una o más uniones fosforotioato, morfolino o fosfonocarboxilato. En algunas realizaciones, el polinucleótido se conjuga a un esteroide, tal como colesterol, una vitamina, un ácido graso, un hidrato de carbono o glicósido, un péptido, u otro ligando de molécula pequeña.

25 Alternativamente la molécula de ADN que codifica para el miR-7 o precursor del mismo se encuentra en un casete de expresión.

El casete de expresión comprende una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células que van a usarse para la expresión, unidas operativamente a un polinucleótido que codifica para el miR-7 o precursor del mismo. “Unidas operativamente”  
30 pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés (es decir, un ADN que codifica para el miR-7 o precursor del mismo) se une a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de

transcripción/traducción *in vitro* o en una célula cuando se introduce el casete o vector de expresión en una célula). “Secuencias reguladoras” incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia  
5 de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y los que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del casete de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión del el miR-7 o precursor del mismo, y  
10 similares. Tales casetes de expresión incluyen normalmente uno o más sitios situados apropiadamente para las enzimas de restricción, para facilitar la introducción del ácido nucleico en un vector.

Pueden seleccionarse fácilmente elementos promotores y/o reguladores apropiados para permitir la expresión del miR-7 o precursor del mismo en la célula de interés. En ciertas  
15 realizaciones, el promotor utilizado para dirigir la expresión intracelular de un miR-7 o precursor del mismo es un promotor para ARN polimerasa III (Pol III). Según otras realizaciones, puede usarse un promotor para ARN polimerasa I, por ejemplo, un promotor de ARNt.

En una realización preferida, el polinucleótido que codifica miR-7 o un precursor del mismo  
20 se encuentra en un vector.

Se conocen en la técnica diversos vectores y pueden modificarse fácilmente para dirigir la transcripción de miR-7 o de un precursor del mismo. Cuando se sintetizan *in vitro* precursores de miARN bicatenarios, puede permitirse que se hibriden las cadenas antes de introducir las en una célula o antes de la administración a un sujeto. miR-7 o precursores del  
25 mismo pueden suministrarse o introducirse en una célula como una única molécula de ARN que incluye partes autocomplementarias (por ejemplo, un ARNhp que puede procesarse de manera intracelular para producir un miARN), o como dos cadenas hibridadas entre sí. En otras realizaciones, miR-7 o el precursor del mismo se transcriben *in vivo*. Independientemente de si el miARN o precursor del mismo se transcribe *in vivo* o *in vitro*, en  
30 cualquier escenario, puede producirse un transcrito primario que entonces puede procesarse (por ejemplo, mediante una o más enzimas celulares) para generar el miARN que logra la inhibición génica.

En otro enfoque, los miARNs pueden expresarse mediante vectores o huéspedes virales atenuados o vectores bacterianos. Pueden usarse vectores de virus vaccinia recombinantes, virus adenoasociados (VAA), herpesvirus, retrovirus, u otros vectores virales.

En un ejemplo, se utiliza un vector viral. Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, herpesvirus, vaccinia, o un virus de ARN tal como un retrovirus. En un ejemplo, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un único gen foráneo incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (VLMuMo), virus del sarcoma murino de Harvey (VSMuHa), virus del tumor mamario murino (VTMMu) y virus del sarcoma de Rous (VSR). Cuando el sujeto es un ser humano, puede utilizarse un vector tal como el virus de la leucemia del mono gibón (VLMG). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador de selección de modo que pueden identificarse y generarse células transducidas. Insertando una secuencia de ácido nucleico que codifica para miR-7 o precursor del mismo en el vector viral, junto con otro gen que codifica para el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico de la diana. Pueden prepararse vectores retrovirales específicos de diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. La selección de diana preferida se logra usando un anticuerpo para seleccionar como diana el vector retroviral. Los expertos en la técnica conocerán cómo, o pueden determinar fácilmente sin experimentación excesiva, secuencias de polinucleótido específicas que pueden insertarse en el genoma retroviral o unirse a una envuelta viral para permitir el suministro específico diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido que codifica para miR-7 o un precursor del mismo.

miR-7 o un precursor del mismo para la fabricación del medicamento para el tratamiento según la invención pueden comprender además un portador farmacéuticamente aceptable.

Un “portador farmacéuticamente aceptable”, “diluyente farmacéuticamente aceptable”, o “excipiente farmacéuticamente aceptable”, o “vehículo farmacéuticamente aceptable”, usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a una carga, material de encapsulación o formulación no tóxicos, sólidos, semisólidos o líquidos auxiliares de cualquier tipo convencional. Un portador farmacéuticamente aceptable es esencialmente no tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y es compatible con otros componentes de la formulación. Por ejemplo, el portador para una formulación que contiene polipéptidos no incluiría normalmente agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para los polipéptidos. Los portadores



adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, dextrosa, glicerol, solución salina, etanol y combinaciones de los mismos. El portador puede contener agentes adicionales tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH o adyuvantes que potencian la eficacia de la formulación

- 5 miR-7 o un precursor del mismo para la fabricación de un medicamento para su uso de acuerdo a la presente invención se pueden administrar por cualquier vía adecuada de administración, por ejemplo una vía oral, sublingual, tópica, rectal o parenteral incluyendo vía subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa. intravascular, intratumoral, intracraneal, intratecal, intraesplénica, intramuscular, subretinal, y mucosa. En  
10 una realización preferida la administración es por vía intratumoral o intravenosa.

La presente invención incluye todas las formas de suministro de ácidos nucleicos, incluyendo oligonucleótidos sintéticos, ADN desnudo, de plásmido y viral, integrados o no en el genoma.

- Tanto los miARNs como los polinucleótidos que codifican los miARNs de interés pueden  
15 introducirse en las células huésped deseadas mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a transfección, electroporación (por ejemplo, electroporación transcutánea), microinyección, transducción, fusión celular, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, uso de una pistola génica, o mediante lipofección.

- Tanto los miARNs como los polinucleótidos que codifican los miARNs pueden administrarse  
20 en una dosis única, o múltiples dosis separadas por un intervalo de tiempo.

Las cantidades terapéuticas para uso terapéutico pueden depender de la gravedad de la enfermedad y la edad, el peso, el estado general del paciente y otros factores clínicos. Por tanto, la determinación final del régimen de tratamiento apropiado se realizará por el médico encargado.

- 25 La invención se describe ahora en detalle por medio de los siguientes ejemplos que se deben considerar como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la invención.

## EJEMPLOS

### Materiales y métodos

#### 1. Modelos celulares

Para la realización de este estudio se han empleado líneas celulares de dos tipos tumorales humanos: cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y cáncer de ovario.

•H23. Línea celular procedente de un paciente no tratado con adenocarcinoma de pulmón no microcítico, obtenida de la ATCC (American type culture collection; Manassas, VA, USA),  
 5 CRL-5800. H460. Línea celular de CPNM no diferenciado derivada del fluido pleural de un paciente, obtenida de la ATCC, HTB-177. A2780. Línea celular procedente de un carcinoma ovárico de origen epitelial, obtenida de la ECACC (European Collection of Cell Cultures; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 93112519. OVCAR3. Línea celular de adenocarcinoma ovárico de origen epitelial, obtenida de la ATCC, HTB-161.

10 La obtención de los subtipos resistentes de cada una de las líneas celulares descritas se llevó a cabo en trabajos previos, sometiéndolas a dosis crecientes de CDDP (Ibanez de Caceres, I. et al Oncogene 29, 1681–1690 (2010)). Como resultado se obtuvieron cuatro parejas de líneas celulares sensibles (S) y resistentes (R): H23S/H23R, H460S/H460R, A2780S/A2780R y OVCAR3S/OVCAR3R. Dichas líneas se cultivaron en medio RPMI al  
 15 10% de FBS (suero bovino fetal) suplementado con 4 ml de Glutamina, 4 ml de Fungizona y 350 µl de Gentamicina. Por otra parte, las cuatro líneas resistentes (H23R, H460R, A2780R y OVCAR3R) se trataron con el agente desmetilante 5aza-dC y el inhibidor de desacetilasas de histonas TSA2, obteniendo así un tercer grupo de líneas resistentes tratadas (RT): H23RT, H460RT, A2780RT y OVCAR3RT.

## 20 2. Selección de miARNs candidatos

La selección de los miARNs candidatos se realizó siguiendo los criterios que se describen a continuación. Inicialmente, se seleccionaron aquellos miARNs que tuvieran un patrón de expresión disminuida en R (con respecto a S) y recuperada en RT en al menos 2 de las 4  
 25 líneas que se analizaron. A partir de ahí, se seleccionaron aquellos que poseen una isla CpG en su región promotora o, en el caso de los miARNs intragénicos, en la región promotora del gen en que se encuentran codificados. A continuación, la selección se hizo en base a las rutas celulares en las que participan los genes diana de cada uno de los miARNs seleccionados, en busca de aquellas implicadas en progresión tumoral y respuesta a quimioterapia. Los recursos bioinformáticos que se utilizaron fueron los siguientes:

30 • GeneCards ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)) y miRBase ([www.miRBase.org](http://www.miRBase.org)). Genecards integra información procedente de más de 100 bases de datos acerca de todos los genes humanos conocidos. miRBase contiene información sobre todas las secuencias de genes de miARNs

conocidos, su ubicación y las secuencias maduras de los mismos. Estas dos bases de datos se utilizaron para una primera búsqueda de información de los miARNs del listado.

- 5 • Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Ensembl constituye un centro de información del genoma de diversas especies, centrándose en la especie humana, a través de la recopilación, creación y organización de recursos de datos. Con esta base de datos obtuvimos información sobre la región del genoma en la que se encuentran los miARNs (inter o intragénicos), así como de los elementos adyacentes a estos. También permite conocer las secuencias del ADNc de las regiones promotoras para comprobar la presencia de islas CpG.
- 10 • CpG Island Searcher ([www.cpgislands.com](http://www.cpgislands.com)) y Webgene ([www.itb.cnr.it/webgene](http://www.itb.cnr.it/webgene)). Los criterios y algoritmos que utilizan estas herramientas bioinformáticas para la predicción de islas CpG fueron propuestos por Takai y Jones:  $GC \geq 55\%$ ,  $CpGObs/CpGEsp \geq 65$  y una longitud  $>200$  pb (Takai, D. & Jones, P. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 3740–3745 (2002). En todos los casos se comprobó la presencia de islas CpG mediante ambos
- 15 recursos.
- WebGestalt ([bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt](http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt)). Esta herramienta de análisis está diseñada para estudios funcionales a gran escala, a partir de un gran listado de genes y sus respectivos miARNs descritos. En concreto, para la clasificación funcional de los genes obtenidos se utilizó Gene Ontology Tree Machine (GOTM) Zhang, B., et al., BMC
- 20 Bioinformatics 5, 16 (2004), herramienta web para el análisis y la visualización de conjuntos de genes de interés basados en jerarquías de ontología génica.

### 3. Análisis de expresión por qRT-PCR

La validación del cambio de expresión visto en los arrays, de los distintos miARNs en los tres grupos experimentales (S, R y RT) de cada una de las líneas celulares se realizó

25 mediante qRT-PCR a partir de muestras de ARN que fueron extraídas siguiendo el método del tiocianato de guanidina usando TRIZOL (Invitrogen), y que fueron purificadas mediante el Kit RNeasy (Qiagen).

Para la obtención del ADNc de los miARNs se partió de 11 ng de ARN total purificado y se utilizó el kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (ID: 4366596, Applied Biosystems),

30 junto con los oligos específicos para retrotranscripción de cada uno de los miARNs valorados (los números de ensayo TaqMan®) así como del miR-RNU48 (ID: 001006, Applied Biosystems). Este último se utilizó como control endógeno debido a que su expresión es constitutiva, es decir, sus niveles no varían como consecuencia de los

tratamientos recibidos por las células. El programa específico utilizado siguió los siguientes parámetros: 30 min a 16°C; 30 min a 42°C; 5 min a 85°C y una temperatura final de 4°C. El producto final fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Una vez obtenido el ADNc se compararon los niveles de expresión entre S, R y RT de cada una de las líneas mediante PCR cuantitativa, utilizando ensayos de expresión cuantitativa TaqMan® (Applied Biosystems). Para ello se utilizó TaqMan® Universal PCR Master Mix (ID: 4304437, Applied Biosystems) y sondas TaqMan® Small ARN Array (20X) para PCR cuantitativa específicas de cada miARN. En cada reacción se utilizaron 1,5 µl de ADNc, en un volumen final de 20 µl. Cada muestra se analizó por triplicado al menos dos veces, usando el 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con un programa que siguió los siguientes parámetros: 10 min a 95°C y cuarenta ciclos de amplificación de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Con esta técnica se mide la fluorescencia emitida después de cada ciclo de amplificación, con lo que la cuantificación se realiza en tiempo real, permitiendo así estimar la cantidad relativa de la secuencia en las distintas muestras durante la fase logarítmica de la reacción Higuchi, R., et al., . Bio/Technology 11, 1026-30 (1993).

La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó con el programa RQ Manager (Life Technologies), que se basa en el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak KJ et al., Methods San Diego Calif 25, 402–408 (2001) mediante el que se calculan los cambios de expresión relativos de cada muestra o tratamiento respecto de una referencia (en este caso controles no tratados). Además la expresión de todas las muestras se normaliza previamente con respecto a la expresión del control endógeno miR-RNU48. Los datos se presentan como el “cambio de expresión en número de veces” (RQ) y las barras de error se expresan como el cálculo máximo (RQ<sub>max</sub>) y el cálculo mínimo (RQ<sub>min</sub>) de los niveles de expresión, representando la desviación estándar de la media del nivel de expresión RQ.

4. Modificación de ADN por bisulfito, posterior secuenciación de las islas CpG y PCR de metilación específica en muestras de pacientes (MSP)

La extracción del ADN de los diferentes grupos experimentales de cada una línea, además del ADN de muestras de tejido normal utilizados como controles (pulmón, ovario, saliva y linfocitos) y de las líneas tumorales PANC-1 e IMIMPC3 (páncreas), LOVO y HT29 (colon), OV4 y SKOV3 (ovario), PC-3 y LNCAP (próstata), BT474 (mama), SW780 (vejiga) H727 y A549 (pulmón), se realizó mediante técnicas convencionales de digestión con proteinasa K (Invitrogen) y extracción con fenol-cloroformo.

Para la modificación de las muestras se partió de 1 µg de ADN genómico que se desnaturalizó con NaOH (0,2 M) durante 10 min a 37°C, posteriormente se modificó el ADN tratándolo con hidroquinona y bisulfito de sodio a 50°C durante 17 h bajo una capa de aceite mineral. El ADN modificado se purificó usando Wizard DNA Clean-Up system (Promega).

- 5 Para completar la modificación se trató el ADN con NaOH (0,3 M) durante 5 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se precipitó con glicógeno, acetato amónico (10 M) y etanol. La modificación del ADN tiene como resultado la conversión de las citosinas no metiladas en uracilos, mientras que las que se encontrasen metiladas son resistentes a la modificación y por tanto continúan siendo citosinas.
- 10 En la secuenciación por bisulfito se amplificaron mediante PCR fragmentos del ADN modificado de las líneas y de los controles pertinentes, que tenían entre 355 y 560 pb y que contenían total o parcialmente las islas CpG de los promotores de cada miARN. Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: a) 1 ciclo a 94°C durante 5 min, b) 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min entre 60-61°C y 1 min a 72°C. Por último c) una
- 15 extensión de 10 min a 72°C. Para correr los productos de la PCR se utilizaron geles de agarosa al 1,5% y las bandas se purificaron con MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). En todos los casos se realizó una secuenciación directa utilizando el analizador genético ABI 3100A. Los datos obtenidos se analizaron con el software Sequencher 5.1.

| OLIGOS               |         | miR-7-3   | miR-132   | miR-335   | miR-148  |
|----------------------|---------|---|---|---|--|
| Sec. por Bisulfito   | Directo | 5-<br>TTAGGAAGAAGT<br>TAGGAGGGGAA<br>A-3<br>(SEQ ID NO:2) | 5-<br>GTTTTAGGTTTTTA<br>YGGGAGTTTA-3<br>(SEQ ID NO: 10) | 5-<br>TGGGAAAGAGGA<br>GGTGAGAAA-3<br>(SEQ ID NO:14)   | 5-<br>GTYGTTT<br>TTTTTTA<br>GTTAGGA<br>GATA-3<br>(SEQ ID<br>NO:16) |
|                      | Reverso | 5-<br>CAAACACCTCAA<br>ACCACCTCT-3<br>(SEQ ID NO:3)        | 5-<br>TACRACRCRACT<br>CCTACACT-3<br>(SEQ ID NO:11)      | 5-<br>CGCTTCCTAAAAC<br>CAAAAATTCT-3<br>(SEQ ID NO:15) | 5-<br>CCRCTCC<br>CTCCAT<br>CTTAACT-<br>3<br>(SEQ ID<br>NO:17)      |
| Tamaño amplicón      |         | 372bp   | 441bp   | 528bp   | 560bp  |
| Sec. por Bisulfito 2 | Directo | 5-<br>TAGTTGGGGAA<br>GTTTTTTTAGG<br>A-3<br>(SEQ ID NO:4)  | 5-<br>AGGAGTYGYGGTY<br>GTATGAATGA-3<br>(SEQ ID NO:12)   |   |  |
|                      | Reverso | 5-<br>TTTCCCCTCCTA  | 5-<br>GTCTCCTAAAACR                                     |   |  |

|                         |         |  |                                |  |  |
|-------------------------|---------|--|--------------------------------|--|--|
|                         |         | ACTTCTTCCT-3<br>(SEQ ID NO:5)                        | CCAACACCTT-3<br>(SEQ ID NO:13) |  |  |
| Tamaño amplicón         |         | 428bp  | 441bp                          |  |  |
| <b>MSP No metilados</b> | Directo | 5-<br>GGGGTGGGGTT<br>TTTTAAGAATT-3<br>(SEQ ID NO:6)  |                                |  |  |
|                         | Reverso | 5-<br>ATAACATTCTCC<br>TCCTTCAATCA-3<br>(SEQ ID NO:7) |                                |  |  |
| Tamaño amplicón         |         | 131bp  |                                |  |  |
| <b>MSP Metilados</b>    | Directo | 5-<br>GGGTGGGGTTT<br>TTTAAGAATC-3<br>(SEQ ID NO:8)   |                                |  |  |
|                         | Reverso | 5-<br>ACATTCTCCTCC<br>TTCGATCG-3<br>(SEQ ID NO:9)    |                                |  |  |
| Tamaño amplicón         |         | 127bp  |                                |  |  |

Tabla 1. Oligos empleados para determinar la metilación de miR-7

Para los ensayos de amplificación con PCR de metilación específica (MSP), el ADN modificado por bisulfito de los pacientes analizados, se amplificó con oligos miARN específicos para ADN metilado versus ADN no metilado para el miARN-7. Como control negativo utilizamos ADN de tejido pulmonar sano, del cual conocemos que no tiene el miARN metilado, y como control positivo utilizamos ADN de linfocitos de pacientes, sin ninguna patología importante previa, metilado artificialmente en nuestro laboratorio con la enzima S-adenosilmetionina (SAM). La reacción se llevó a cabo con un programa con los siguientes parámetros: 5 minutos a 95°C y 2 minutos a 80°C, momento en el que incorporamos la ADN polimerasa seguido de 35 ciclos con 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C y 50 segundos a 72°C seguidos de una extensión final de 8 minutos a 72°C. Los productos de PCR se separaron en un gel de poliacrilamida al 5% en condiciones no desnaturalizantes.

15 5. Transfección celular con el precursor del miR-7 y viabilidad celular asociada

Para estudiar la existencia de una verdadera conexión entre la expresión del miR-7 y la viabilidad celular, se realizaron ensayos funcionales utilizando precursores del miR-7, hsa-

miR-7-5p (PremiR hsa-miR-7, ID:PM10047, Life technologies) para inducir su expresión, los cuales son ARN de cadena doble modificados químicamente que imitan a los miARNs endógenos y permiten el análisis funcional de la regulación de la actividad de los miARNs. La sobreexpresión se realizó en H23R y A2780R, puesto que son las líneas celulares en las que se validó por qRT-PCR la expresión del miR-7 tras el tratamiento con cisplatino. También se transfectaron controles negativos en las mismas líneas celulares, H23R y A2780R, lo que sirve de control interno de la expresión del miR-7. La transfección con el precursor del miR-7, se llevó a cabo utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen), como recomienda la casa comercial. La cantidad de control negativo y miR-7 transfectado fue a una concentración de 50 nM por p60.

La respuesta en viabilidad celular tras la transfección del precursor del miR-7, se valoró en las células H23R (R-M) y A2780R (R-M) transfectadas con dicho precursor en comparación con las correspondientes resistentes transfectadas con el control negativo A2780 (R-C y R-C) para identificar si el miR-7 está actuando como posible supresor tumoral. Este ensayo se realiza por cuadruplicado, sembrando 80.000 células por pocillo de los cuatro grupos experimentales en placas de 24 pocillos para posteriormente tratarlas con el control negativo o con el precursor del miR-7 durante 72 horas. Posteriormente, las células se fijan y tiñen con cristal violeta, valorando la intensidad de la tinción por una prueba de ELISA, calculando la proporción de tinción en las células transfectadas con el precursor del miR-7 respecto a los controles, siguiendo el método descrito previamente por Chattopadhyay (Chattopadhyay, S.. Oncogene 25(23), 3335-3345 (2006))

### EJEMPLO 1 Identificación de los miARNs candidatos

La resistencia a platino de las líneas celulares empleadas en el estudio se puede observar en la Figura 1.

|         | IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ DE | CDDP-IR | valor P |
|---------|------------------------------------|---------|---------|
| H23S    | 0,28 $\pm$ 0,01                    | -       | -       |
| H23R    | 0,94 $\pm$ 0,09                    | 3,35    | <0,001  |
| A2780S  | 0,15 $\pm$ 0,08                    | -       | -       |
| A2780R  | 0,45 $\pm$ 0,04                    | 3,00    | <0,001  |
| H460S   | 0,46 $\pm$ 0,37                    | -       | -       |
| H460R   | 1,60 $\pm$ 0,26                    | 2,50    | <0,001  |
| OVCAR3S | 0,60 $\pm$ 0,05                    | -       | -       |
| OVCAR3R | 1,50 $\pm$ 0,14                    | 2,96    | <0,001  |

Tabla 2. IC<sub>50</sub> frente al agente Cisplatino e Índice de resistencias (IR).

De entre todos los miARNs identificados en los arrays de expresión, se encontraron 129 con un patrón de expresión disminuida en las líneas resistentes (R), como resultado de la resistencia adquirida tras las exposiciones a cisplatino, expresión que se recuperaba en parte, tras el tratamiento con reactivación epigenética (RT). Por otra parte, de todos los genes analizados en los arrays de expresión de genoma completo, se encontraron 2755 genes con un patrón de expresión contrario al buscado en los ensayos con miARNs, es decir, expresión aumentada en R y disminuida en RT, que además presentaban un p-valor ajustado de FDR menor que 0,05.

De esos 129 miARNs, se descartaron aquellos que solo presentaban el patrón de expresión descrito en 1 de las 4 líneas analizadas, así la lista de los candidatos quedó reducida a 56 miARNs. A continuación se analizó la región promotora de cada miARN para encontrar la presencia de alguna isla CpG con las características descritas por Takai y Jones, supra y se encontró que 14 de los 56 miARNs tenían una isla CpG en las 2000 pb previas y posteriores al inicio de su secuencia, y en otros 5 se encontraba en las 2000 pb previas y posteriores al sitio de inicio de la transcripción del gen en que se encontraban codificados. Es decir, en un total de 19 miARNs se encontró la presencia de al menos una isla CpG potencialmente reguladora.

Para continuar con la identificación de los mejores miARNs candidatos se realizó un tercer filtrado basado en la agrupación ontológica de los posibles genes diana de los 19 miARNs identificados y tener así una visión global de la potencial implicación del miARN en progresión tumoral y respuesta a quimioterapia. Se realizaron 19 análisis en base a la información obtenida con Gene Ontology Tree Machine (GOTM) utilizando dos listados para cada miARN estudiado, uno de ellos con los 2755 genes seleccionados del array y el otro con los genes regulados por cada uno de los 19 miARNs, obtenidos por complementariedad de secuencia, como se detalla en el apartado 3 de los materiales y métodos. Esta herramienta compara y analiza ambos listados marcando aquellos genes que, con un nivel de significación  $p < 0,005$ , tienen una aparición mayor de la esperada si se hubieran escogido al azar. Esto permitió identificar rutas con implicación en crecimiento y proliferación celular, apoptosis, transporte de membrana o remodelación de la cromatina, entre otras, que podrían estar reguladas por un mismo miARN. Esto derivó en la selección de 10 miARNs candidatos para su posterior validación epigenética.



**EJEMPLO 2. Validación de los cambios de expresión de los miARNs seleccionados**

Los resultados obtenidos por qRT-PCR muestran los cambios de expresión en los 3 grupos experimentales (S, R y RT) de los 10 miARNs seleccionados. Cada miARN se validó en las 4 líneas (H23, H460, A2780 y OVCAR3), aunque en la Figura 2 únicamente están representadas las líneas en las que se habían identificado cambios significativos de expresión previamente en los arrays, para simplificar su comprensión.

En 8 de los 10 miARNs candidatos se registró una disminución de expresión en R con respecto a S y una recuperación en RT tras el tratamiento epigenético, en la línea H23 en los arrays de expresión, datos que se validaron en su totalidad por qRT-PCR. En la línea H460, en los arrays, se encontraron también 8 de los 10 miARNs con el patrón de expresión definido, 7 de ellos compartidos con la otra línea de CPNM H23, de los cuales se validaron totalmente el miR-148a y el miR-335. En el resto de los miARNs analizados, excepto en el miR-340, existe una validación parcial, ya que en miR-7, miR-9, miR-10a y miR-132 aumenta la expresión en RT, aunque no hubo cambios significativos en el grupo experimental R, y en el miR-124 sí se registró un descenso de la expresión en R, pero no se observó reexpresión tras el tratamiento epigenético. El miR-340 es el único miARN en el que no se validó ningún cambio. En el caso de la línea de cáncer de ovario A2780, en los arrays se observó el patrón de expresión definido en 6 de los 10 miARNs candidatos, y en 3 de ellos se validó por qRT-PCR: miR-7, miR-10a y miR-132. En los miARNs 124 y 203 no se observaron cambios significativos de expresión entre las células sensibles y resistentes, sin embargo en ambos se produce un aumento de la expresión en las células tratadas epigenéticamente. El microARN 149 no presenta cambios de expresión relevantes en esta línea. Por último, OVCAR3 es la línea en la que, según los arrays, se observó el menor número de miARNs con los cambios de expresión específicos, y de hecho solo se observan validaciones parciales, ya que el miR-124 y 132 se reactivan en RT pero no existe descenso de expresión en R, y en el miR-149 sí se registra un descenso en R pero no se produce la recuperación en RT.

En total 4 miARNs se validan en al menos 2 líneas: miR-148a y miR-335 en las líneas de CPNM H23 y H460, y miR-132 y 7 en H23 y en la línea de cáncer de ovario A2780. Y miR-7 en 2 de las 3 que predijeron los arrays de expresión (H23 y A2780). Dichos miARNs fueron escogidos para la siguiente fase del estudio, la valoración del estado de metilación de su isla CpG reguladora.

**EJEMPLO 3. Estado de metilación de las islas CpG analizadas**

El estudio del estado de metilación de las islas CpG se realizó en los 4 miARNs seleccionados tras la validación de los cambios de expresión por qRT-PCR, miR-148a, miR-335, miR-132 y miR-7. El miR-148a se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 y posee una isla CpG de 1663 pb, situada a 150 pb del primer nucleótido de su secuencia. Se  
5 analizó una región de 560 pb de la isla CpG en los grupos experimentales S y R de las líneas H23 y H460, además de tejido normal de pulmón. Los resultados de la secuenciación por bisulfito no mostraron metilación en ninguna de las líneas tumorales ni en los controles de tejido normal examinados. El miR-335 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, en el segundo intrón del transcrito 002 del gen MEST. En la región promotora del gen hay  
10 una isla CpG de 1123 pb, de la que se analizó un fragmento de 528 pb. Los análisis se hicieron en las líneas de CPNM H23S y R, H460S y R, además de tejido normal de pulmón. Los resultados mostraron metilación en la línea H460, tanto en S como en R. Sin embargo no ocurría lo mismo con H23S o R ni con el pulmón normal. Adicionalmente se analizó el estado de metilación del ADN de 3 líneas tumorales (LOVO, OV4 y PC-3) y de una muestra  
15 de saliva normal. Los resultados de este análisis no presentaron metilación en ninguno de los casos. El microARN 132 está situado en el brazo corto del cromosoma 17. En su región promotora, abarcando también la secuencia del miARN y parte de la región posterior, hay una isla CpG de 2080 pb. La región analizada abarca 866pb y se realizó utilizando 2 parejas de oligos (SEQ ID NO: 10 y 11; SEQ ID NO: 12 y 13). En este caso las líneas que se  
20 analizaron fueron H23 (S y R) y A2780 (S y R), junto con tejido normal de pulmón y de ovario. En todos los casos los resultados mostraron ausencia de metilación. El miR-7 posee 2 islas CpG en su región promotora. Una de ellas se sitúa a una distancia de 861pb del primer nucleótido del miARN y tiene una longitud de 667 pb. La segunda isla tiene una extensión de 269 pb y engloba al miARN. Para el análisis de la primera isla se diseñaron 2  
25 parejas de oligos (SEQ ID NO: 2 y 3; SEQ ID NO: 4 y 5) que abarcaban un total de 776 pb, incluyendo la totalidad de la isla y parte de las zonas adyacentes. El estudio se realizó en las líneas H23 y A2780, en las células sensibles y resistentes en ambos casos, además de los controles de tejido normal de pulmón y ovario. Los resultados de la secuenciación mostraron la presencia de metilación en las células resistentes de las líneas H23 y A2780. Los  
30 controles de pulmón y ovario no presentaban metilación. Estos resultados se complementaron con el análisis de 11 líneas tumorales, entre las que se encuentran: BT474, SKOV3, LOVO, IMIMPC2 y SW780. Los resultados en estas líneas muestran la presencia del mismo patrón de metilación en 2 líneas, LOVO e IMIMPC2, y ausencia de metilación en las demás. Por otra parte, de la segunda isla se analizó una región de 355 pb en las líneas  
35 H23S y R, A2780S y R, junto con los controles de tejido normal de pulmón y ovario. En todos los casos las secuencias se encontraban metiladas.

En resumen, de los cuatro miARNs validados, especialmente 2 de ellos (miR-335, miR-7) presentan metilación específica en una isla CpG cercana a la región donde están codificados.

**EJEMPLO 4. La metilación del miR-7 es un evento frecuente en muestras de pacientes con CPNM en estadios tempranos**

La valoración de la metilación del miR-7 en 36 muestras de pacientes de cáncer de pulmón indica: 1) que la metilación de este miRNA puede ser un evento frecuente en pacientes con cáncer de pulmón (53% de los individuos afectados) y que pudiera ser pronóstico del desarrollo futuro de cáncer de pulmón ya que también aparece en muestras de pacientes con patologías no tumorales (enfisemas).

**EJEMPLO 5. La sobreexpresión del miR-7 induce una mortalidad de aproximadamente un 60% en las líneas resistentes a platino.**

Se validó la correcta transfección del miR-7 por qRT-PCRs únicamente en los casos en los que se había validado previamente en los datos de arrays una expresión inhibida en células Resistentes. De este modo, se comprobó que tras el ensayo se produce una verdadera sobreexpresión del miR-7, para de esta manera asegurar que ha tenido lugar una correcta transfección y que el precursor del miR-7 actúa correctamente.

Tras la transfección del precursor del miR-7, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular para determinar la respuesta producida como consecuencia de la sobreexpresión de dicho microARN en las líneas H23R y A2780R, puesto que son aquellas en las que se validó una expresión inhibida en resistencia del miR-7. A tiempo cero obtuvimos una elevada mortalidad de las células tratadas como el precursor del miR-7 frente a los controles, llegando a niveles del 63% de viabilidad celular en H23 y del 52% en A2780 (Figura 3).

**EJEMPLO 6. La metilación del miARN-7 es un potencial biomarcador predictivo de recurrencia y supervivencia global en pacientes con cáncer de ovario.**

La valoración de la metilación del miR-7 en 83 pacientes con cáncer de ovario indica que en estos pacientes se presenta en una frecuencia del 29% de las mujeres afectadas, pero sin embargo está estrechamente relacionado con peor respuesta al tratamiento con derivados de platino y menor tiempo a la progresión tumoral. Los datos indican que el 50% de las pacientes con miR-7 metilado que reciben terapia con platino recurren antes de los 18 meses. Por otra parte, el 75,5% de las mujeres sin recaída de la enfermedad, presentan miR-7 no metilado. Además la supervivencia global en mujeres con ausencia de metilación

de este marcador, es en 40 meses superior al grupo de pacientes con el miR-7 metilado (> 3 años) (Figura 4 y Tabla 3).

|                          |                | Serie Completa<br>(n=83) |      | No metilado (n=59) |      | Metilado (n=24)    |      |          |
|--------------------------|----------------|--------------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|----------|
| Características          |                | Nº de<br>pacientes       | %    | Nº de<br>pacientes | %    | Nº de<br>pacientes | %    | <i>P</i> |
| Edad (mediana,<br>rango) |                | 55 (17-84)               |      | 59 (17-80)         |      | 55 (18-84)         |      | 0,88     |
| Estado<br>menopáusico    |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,565    |
|                          | Premenopausia  | 34                       | 41,0 | 23                 | 39,0 | 11                 | 45,8 |          |
|                          | Postmenopausia | 49                       | 59,0 | 36                 | 61,0 | 13                 | 54,2 |          |
| Paridad                  |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,974    |
|                          | No             | 24                       | 28,9 | 17                 | 28,8 | 7                  | 29,2 |          |
|                          | Sí             | 59                       | 71,1 | 42                 | 71,2 | 17                 | 70,8 |          |
| Historia Familiar        |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,684    |
|                          | No             | 58                       | 69,9 | 42                 | 71,2 | 16                 | 66,7 |          |
|                          | Sí             | 25                       | 30,1 | 17                 | 28,8 | 8                  | 33,3 |          |
| Escala ECOG              |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,025    |
|                          | 0              | 21                       | 25,3 | 20                 | 33,9 | 1                  | 4,2  |          |
|                          | 1              | 36                       | 43,4 | 22                 | 37,3 | 14                 | 58,3 |          |
|                          | 2              | 20                       | 24,1 | 12                 | 20,3 | 8                  | 33,3 |          |
|                          | 3              | 6                        | 7,2  | 5                  | 8,5  | 1                  | 4,2  |          |
| Ascitis                  |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,025    |
|                          | No             | 47                       | 56,6 | 38                 | 64,4 | 9                  | 37,5 |          |
|                          | Sí             | 36                       | 43,4 | 21                 | 35,6 | 15                 | 62,5 |          |
| Grado del Tumor          |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,346    |
|                          | I              | 34                       | 41   | 27                 | 45,8 | 7                  | 29,2 |          |
|                          | II             | 24                       | 28,9 | 15                 | 25,4 | 9                  | 37,5 |          |
|                          | III            | 25                       | 30,1 | 17                 | 28,8 | 8                  | 33,3 |          |
| Histología               |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,851    |
|                          | Seroso         | 49                       | 59,0 | 34                 | 57,6 | 15                 | 62,5 |          |
|                          | Mucinoso       | 9                        | 10,8 | 7                  | 11,9 | 2                  | 8,3  |          |
|                          | Célula Clara   | 8                        | 9,6  | 5                  | 8,5  | 3                  | 12,5 |          |
|                          | Otros          | 17                       | 20,5 | 13                 | 22,0 | 4                  | 16,7 |          |
| Quimioterapia            |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,956    |
|                          | Adyuvante      | 59                       | 71,1 | 43                 | 72,9 | 16                 | 66,7 |          |
|                          | Neoadyuvante   | 6                        | 7,2  | 3                  | 5,1  | 3                  | 12,5 |          |
|                          | Metastásica    | 18                       | 21,7 | 13                 | 22,0 | 5                  | 20,8 |          |
| Recaída                  |                |                          |      |                    |      |                    |      | 0,286    |
|                          | No             | 49                       | 59,0 | 37                 | 62,7 | 12                 | 50,0 |          |

|        |    |    |      |    |      |    |      |       |
|--------|----|----|------|----|------|----|------|-------|
|        | Sí | 34 | 41,0 | 22 | 37,3 | 12 | 50,0 |       |
| Exitus |    |    |      |    |      |    |      | 0,119 |
|        | No | 49 | 59   | 38 | 64,4 | 11 | 45,8 |       |
|        | Sí | 34 | 41   | 21 | 35,6 | 13 | 54,2 |       |

Tabla 3. Tabla demográfica en la que se muestran las características tumorales de 83 pacientes con cáncer de ovario y el estado de metilación del miARN-7.

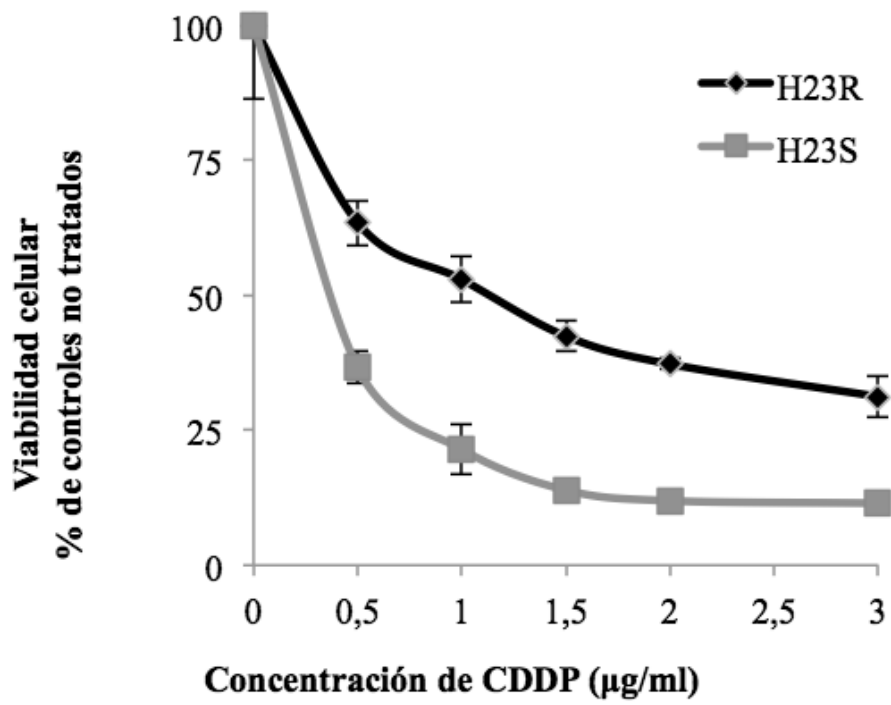
5

El término “Sequense listing” en la lista de secuencias se refiere a “Lista de secuencias”, “Artificial Sequense” a “Secuencia artificial” y el término “DNA” se refiere a “ADN”.

**REIVINDICACIONES**

- 1-Un método para determinar la respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino en una paciente de cáncer de ovario que comprende
- 5 (i) determinar el nivel de metilación en la isla CpG de secuencia SEQ ID NO:1 en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 en una muestra de dicha paciente, y
- (ii) comparar el nivel de metilación en dicha isla CpG en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 con un valor de referencia
- 10 correspondiente,
- en donde un incremento en el nivel de metilación obtenido en (i) o una disminución en el nivel de expresión obtenido en (i) con respecto al valor de referencia correspondiente, es indicativo de que el cáncer de ovario de dicha paciente es resistente a dicho compuesto de platino.
- 15
- 2- Método según la reivindicación 1 en donde el compuesto antitumoral basado en platino es cisplatino.
- 3- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el cáncer de ovario es un carcinoma de ovario de origen epitelial.
- 20
- 4- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el nivel de metilación en la isla CpG del gen que codifica mir-7 se determina mediante PCR de metilación específica.
- 25
- 5- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el nivel de expresión de mir-7 se determina mediante qRT-PCR.

A



B

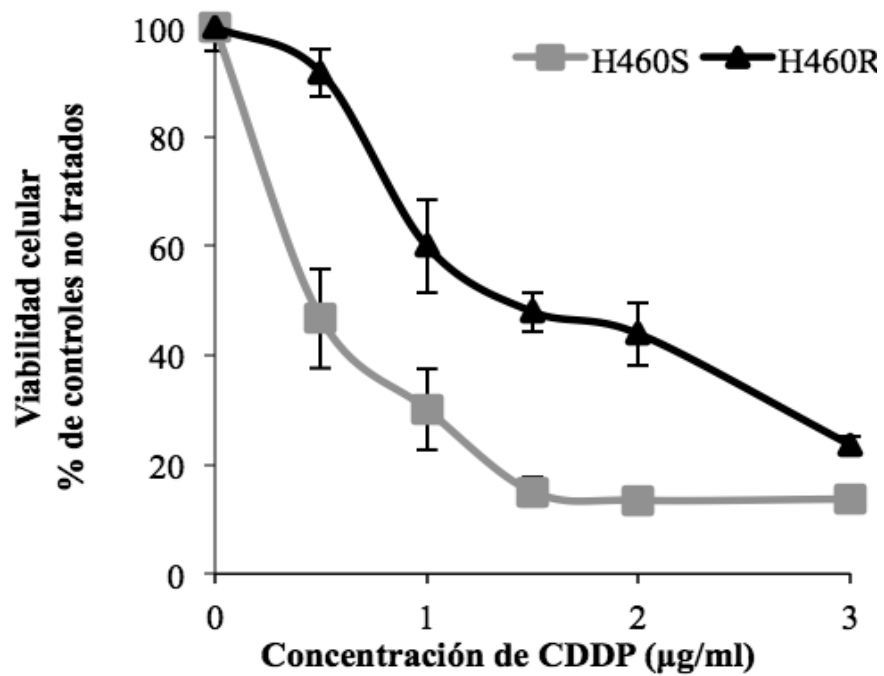
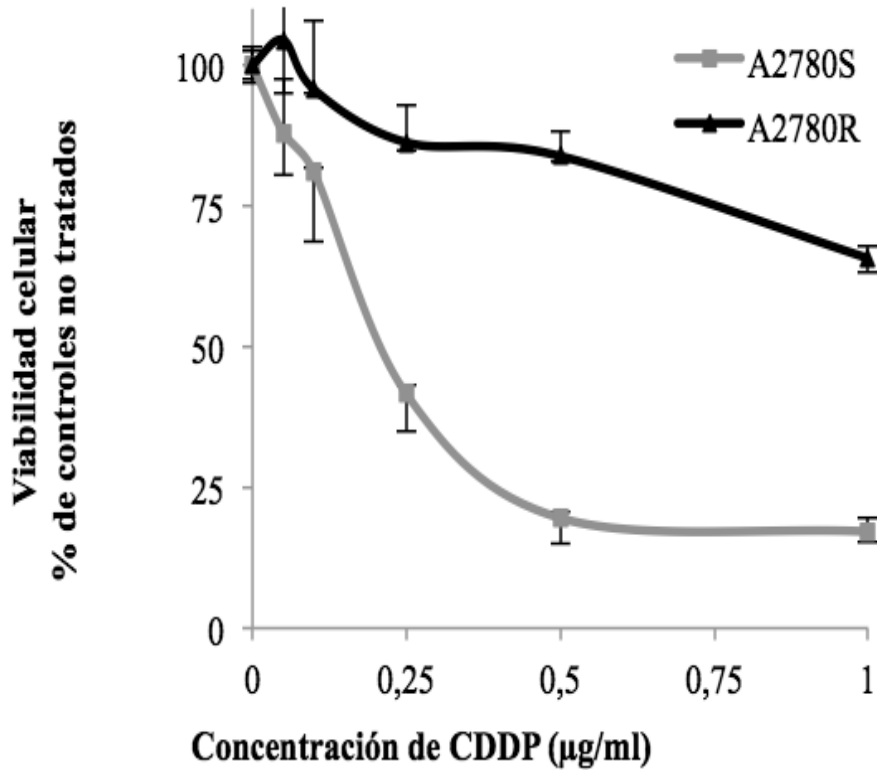


Fig. 1

C



D

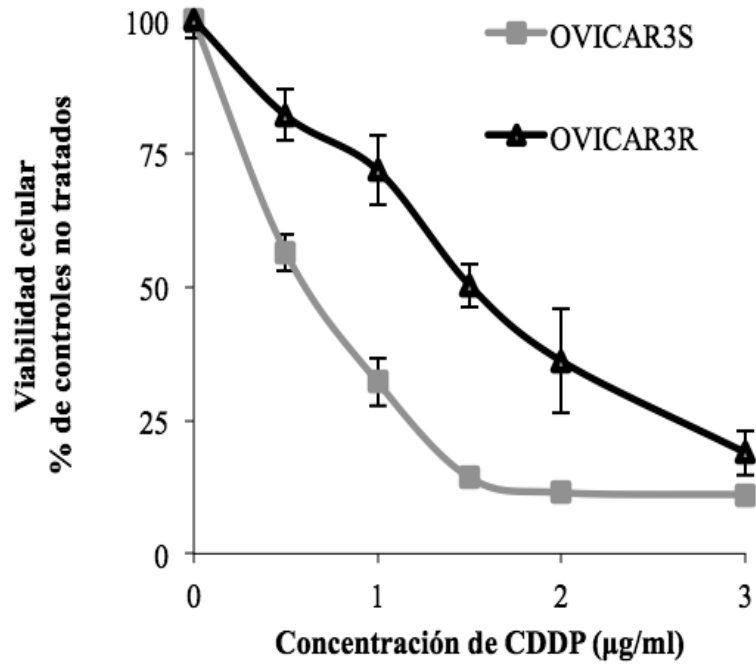


Fig. 1 (cont.)



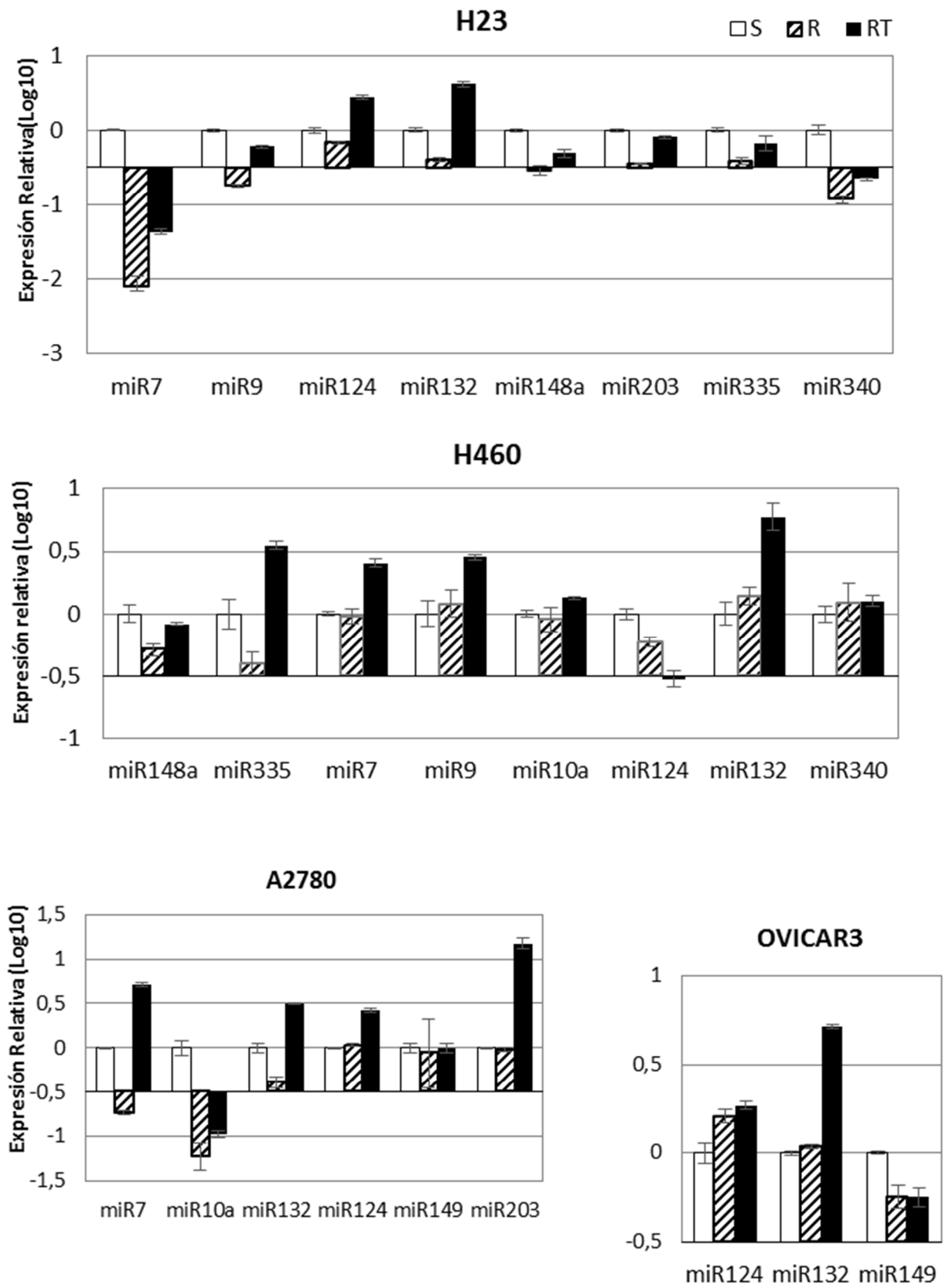


Fig. 2

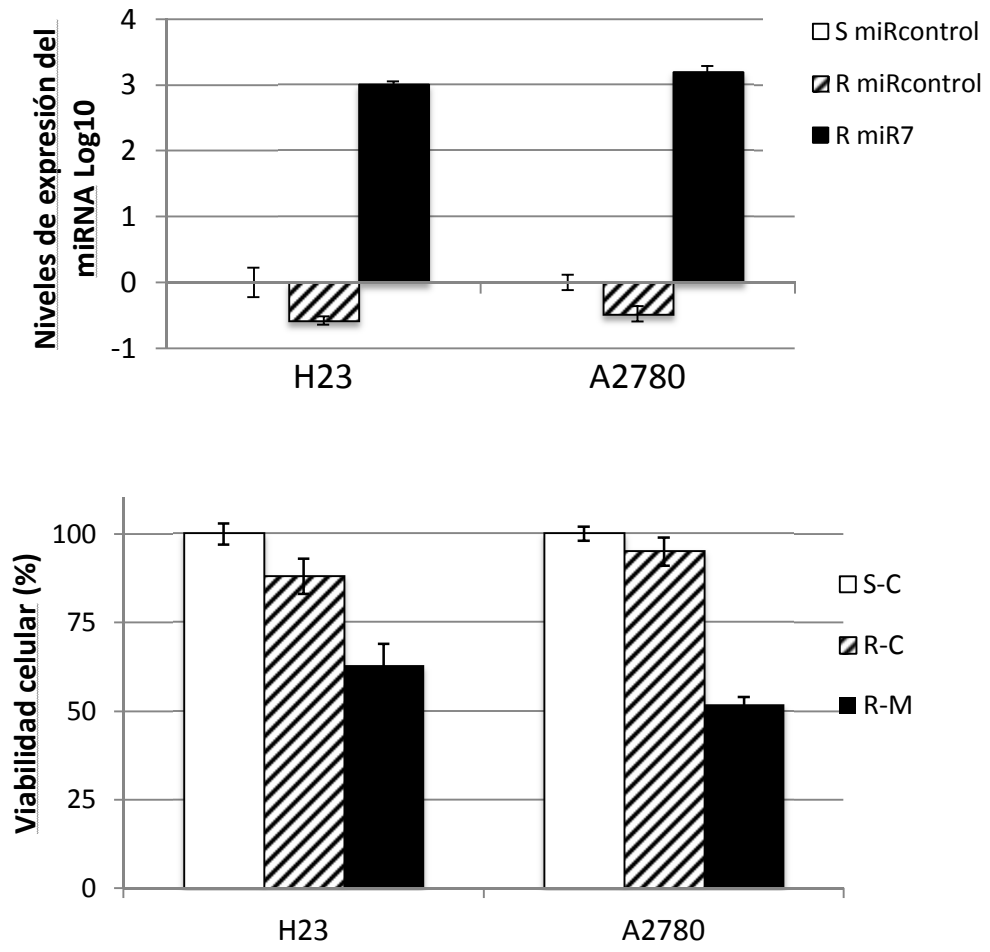


Fig. 3

Listado de Secuencias

<110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL  
UNIVERSITARIO DE LA PAZ  
5 CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

<120> Determinación de la metilación y niveles de un miARN en respuesta  
10 a un compuesto antitumoral basado en platino

<130> P11783ES00

<160> 17  
15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 668  
20 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> isla CpG en el gen que codifica miR-7  
25

<400> 1  
cgccctcggca gccacgggac acctgcatct gccacaaga ctggaagcag gtgaggcaca 60  
cagaggggga ggcccgcagc tgcgtgggag gaggggtggt ctgagggacg tgggatgccg 120  
30 ggaatgaggc tggtttgag gttggcgcat ggacattttc ccagaaaggg acagagacgg 180  
cgaagtttga cggctctgaa agcagagacc agcagggctg actgcttggg aggtaagtcc 240  
35 tggggacatg gtacaggggtg aggagcaggt atcagtgcta gttgcgaccc ctctgtgtct 300  
cccccccgcc accccattgc cattctgaag ctcccagga agaagctagg aggggaaata 360

# ES 2 596 711 A1

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
|           | aattgagtgg ggggtggggtt tccaagaat cggaggaacc gagaacgaag aggggtgggg | 420 |
|           | gaacggggaa agagagagga aatcaagtt ttcttcagca cgaggacag ctctccaccg   | 480 |
| <b>5</b>  | accgaaggag gagaatgcta tttatttcag caccaaatat ccggacagcg cctctcggga | 540 |
|           | ggtccgagaa gagaaccgcg atctgtttca gcaccggggc tcaggacagt tcccagcggg | 600 |
| <b>10</b> | ctocgtttcg tctccagaac cctggacagc tcctccaggt aacgggagag ccctttgacc | 660 |
|           | ctgatttt  | 668 |
| <b>15</b> | <210> 2   |     |
|           | <211> 24  |     |
|           | <212> DNA   |     |
|           | <213> Artificial Sequence   |     |
| <b>20</b> | <220>   |     |
|           | <223> Oligo directo miR-7-3 secuenciación por bisulfito           |     |
|           | <400> 2   |     |
|           | ttaggaagaa gtaggaggg gaaa   | 24  |
| <b>25</b> |   |     |
|           | <210> 3   |     |
|           | <211> 22  |     |
|           | <212> DNA   |     |
| <b>30</b> | <213> Artificial Sequence   |     |
|           | <220>   |     |
|           | <223> Oligo reverso mir-7-3 secuenciación por bisulfito           |     |
| <b>35</b> | <400> 3   |     |
|           | caaacacctc aaaccacct ct   | 22  |

# ES 2 596 711 A1

- <210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
**5** <213> Artificial Sequence
- <220>  
<223> oligo directo mir-7-3 secuenciación por bisulfito 2
- 10** <400> 4  
tagttgggga agtttttttt agga 24
- <210> 5  
**15** <211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
**20** <223> Oligo reverso mir-7-3 secuenciación por bisulfito 2
- <400> 5  
tttccccctcc taacttcttc ct 22
- 25**
- <210> 6  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- 30**
- <220>  
<223> Oligo directo miR-7-3 MSP no metilado
- <400> 6  
**35** ggggtggggt tttttaagaa tt 22

# ES 2 596 711 A1

<210> 7  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

**5**

<220>  
<223> Oligo reverso miR-7-3 MSP no metilado

<400> 7

**10** ataacattct cctccttcaa tca 23

<210> 8  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

**15**

<220>  
<223> Oligo directo miR-7-3 MSP metilado

**20**

<400> 8  
gggtgggggtt ttttaagaat c 21

**25** <210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

**30** <220>  
<223> Oligo reverso miR-7-3 MSP metilado

<400> 9  
acattctcct ccttcgatcg 20

**35**

<210> 10

# ES 2 596 711 A1

- <211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- 5** <220>  
<223> Oligo directo miR-132 secuenciación por bisulfito
- <400> 10  
gttttagggtt tttagggag tta 24
- 10**
- <210> 11  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- 15**
- <220>  
<223> Oligo reverso miR-132 secuenciación por bisulfito
- 20** <400> 11  
tacracrcr actcctacac act 23
- <210> 12  
**25** <211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
**30** <223> Oligo directo miR-132 secuenciación por bisulfito 2
- <400> 12  
aggagtygyg gtygtatgaa tga 23
- 35**
- <210> 13  
<211> 23

# ES 2 596 711 A1

- <212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>
- 5** <223> Oligo reverso miR-132 secuenciación por bisulfito 2
- <400> 13  
gtctcctaaa acrccaacac ctt 23
- 10**
- <210> 14  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- 15**
- <220>
- <223> Oligo directo miR-335 secuenciación por bisulfito
- <400> 14
- 20** tgggaaagag gaggtgagaa a 21
- <210> 15  
<211> 23
- 25** <212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Oligo reverso miR-335 secuenciación por bisulfito
- 30**
- <400> 15  
cgcttcctaa aacccaaaat tct 23
- 35** <210> 16  
<211> 26  
<212> DNA



# ES 2 596 711 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligo directo miR-148 secuenciación por bisulfito

**5**

<400> 16

gtygtttttt ttttagttag gagata

26

**10** <210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

**15** <220>

<223> Oligo reverso miR-148 secuenciación por bisulfito

<400> 17

ccrctccctt ccatcttaac t

21

**20**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201530997

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.07.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | DAI W. <i>et al.</i> Promoter CpG Island Methylation of Genes in Key Cancer Pathways Associates with Clinical Outcome in High-Grade Serous Ovarian Cancer. <i>Clinical Cancer Research</i> . 2013. Vol. 19(20), pp. 5788-5797, página 5788, resumen ; página 5789, columna 1. | 1-5                        |
| A         | WO 2013056217 A1 (THE OHIO STATE UNIVERSITY [US/US]) 18.04.2013, página 1, párrafo [0005]; página 3, párrafo [0007]; reivindicaciones 1-20.   | 1-5                        |
| A         | US 20130096185 A1 (HERMEKING <i>et al.</i> ) 18.04.2013, Página 1, párrafos [0001] - [0006]; reivindicaciones 1, 5.   | 1-5                        |
| A         | US 20130059015 A1 (LANCASTER <i>et al.</i> ) 07.03.2013, página 1, párrafo [0002]; página 2, párrafo [0013]; reivindicaciones 1, 24.  | 1-5                        |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
27.10.2016

Examinador  
M. D. García Grávalos

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PUBMED, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.10.2016

**Declaración**

|   |                      |           |
|---|----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-5 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones     | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-5 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones     | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación  | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01       | DAI W. <i>et al.</i> Clinical Cancer Research. 2013. Vol. 19(20), pp. 5788-5797. | 2013              |
| D02       | WO 2013056217 A1   | 18.04.2013        |
| D03       | US 20130096185 A1  | 18.04.2013        |
| D04       | US 20130059015 A1  | 07.03.2013        |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto técnico de la búsqueda es un método para determinar la respuesta a un tratamiento antitumoral basado en compuestos de platino en una paciente con cáncer de ovario mediante la determinación del nivel de metilación de la isla CpG de secuencia definida como SEQ ID NO: 1 en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7 en una muestra aislada de dicha paciente (reivindicaciones 1-5).

El documento D01 divulga un estudio relacionado con los niveles de metilación en el promotor de islas CpG de genes implicados en la ruta del cáncer de ovario epitelial y su asociación con la respuesta clínica a una terapia basada en compuestos de platino (ver página 5788, resumen ; página 5789, columna 1).

El documento D02 divulga un método para diagnóstico de cáncer de ovario, resistente a productos quimioterapéuticos, mediante la detección del nivel de expresión de los microRNAs miR-484, miR-642, miR-217 en una muestra aislada de una paciente (ver página 1, párrafo [0005]; página 3, párrafo [0007]; reivindicaciones 1-20).

El documento D03 divulga un método para diagnóstico y tratamiento de un paciente con cáncer, preferentemente con un tipo de cáncer asociado a una metilación defectuosa en la isla CpG del promotor del miR-34a (ver página 1, párrafos [0001] - [0006]; reivindicaciones 1, 5).

El documento D04 divulga una serie de microRNAs asociados a la respuesta que presentan a productos quimioterapéuticos diferentes líneas celulares aisladas de cáncer en humanos (ver página 1, párrafo [0002]; página 2, párrafo [0013]; reivindicaciones 1, 24).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)****1.1. REIVINDICACIONES 1-5**

Los documentos citados divulgan el uso de microRNAs, así como de la metilación de las islas CpG en promotores de microRNAs, en métodos de diagnóstico y/o respuesta a un tratamiento con quimioterapéuticos en pacientes con cáncer. De hecho, el documento D01 anticipa esta relación en un estudio realizado con muestras aisladas de pacientes con cáncer de ovario y sometidas a un tratamiento basado en compuestos derivados de platino.

La principal diferencia entre D01 y el objeto técnico de la presente invención radica en el marcador empleado para llevar a cabo el método de la invención, método para determinar la respuesta, en una muestra aislada de una paciente con cáncer de ovario, a un tratamiento antitumoral basado en compuestos de platino mediante la determinación del nivel de metilación de la isla CpG de secuencia definida como SEQ ID NO:1 en el gen que codifica miR-7 o el nivel de expresión de miR-7.

De este modo, se considera que el método reivindicado en la presente invención ofrece una alternativa diferente a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-5 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (**Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986**).

Los documentos D02-D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente invención.