

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 146**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2011 PCT/US2011/060349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12065049**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2011 E 11840508 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2637673**

54 Título: **Métodos relacionados con microARN-21 y reparación de desapareamiento en cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

12.11.2010 US 413180 P

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

22.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CROCE, CARLO, M. y
VALERI, NICOLA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 606 146 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos relacionados con microARN-21 y reparación de desapareamiento en cáncer colorrectal

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular. Más en particular, se refiere a la tecnología relacionada con el cáncer. Ciertos aspectos de la invención incluyen la aplicación en el diagnóstico, la terapéutica y el pronóstico de cánceres colorrectales asociados a miR-21. En particular, en el presente documento se analizan miR21, reparación de desapareamiento y cáncer colorrectal.

Antecedentes de la invención

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres de más frecuente aparición en los EE.UU., con más de 140.000 nuevos casos y aproximadamente 50.000 muertes esperadas en 201. La quimioterapia basada en 5-fluorouracilo (5-FU) representa el patrón oro para el tratamiento del CCR tanto en el entorno adyuvante como metastásico. Sin embargo, la resistencia primaria o adquirida a tratamientos con análogos de la pirimidina representa un problema común en el tratamiento de pacientes con CCR. Estas observaciones destacan la necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia y terapias más efectivas.

Los microARN son una clase de ARN no codificantes pequeños que actúan como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica y la homeostasis celular. La sobreexpresión de miR-21 es un rasgo común de muchos tumores malignos sólidos y hematológicos. La sobreexpresión de miR-21 se ha encontrado en muestras de sangre y de heces de pacientes afectados por CCR. Además, la sobreexpresión de miR-21 está asociada con un escaso beneficio de la quimioterapia adyuvante de 5-FU en CCR en estadio II y III.

El sistema de reparación de desapareamiento (MMR) participa en el reconocimiento y la reparación de daños del ADN. hMSH2 y hMLH1 funcionan como proteínas de MMR del núcleo y forman heterodímeros con los homólogos de proteína hMSH3 o hMSH6 y hMLH3 o hPMS2 respectivamente. La formación de heterodímeros es fundamental para el reconocimiento de daños en el ADN y representa una etapa crucial para la estabilidad de los homólogos de proteína de MMR. Los defectos en las proteínas de MMR se han asociado con un beneficio reducido o ausente de la quimioterapia adyuvante de 5-FU en ensayos clínicos. El deterioro de MMR parece provocar una incorporación reducida de metabolitos de 5-FU en el ADN, llevando a una parada de G2/M reducida y a apoptosis tras el tratamiento con 5-FU.

La sobreexpresión de miR-21 está relacionada con varios tumores humanos incluyendo cáncer colorrectal, en el que parece regular la expresión de genes supresores tumorales incluyendo p21, PTEN, TGFβRII y Bax.

IA ASANGANI ET AL: "MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer", ONCOGENE, vol. 27, n.º 15, 3 de abril de 2008 (2008-04-03), páginas 2128-2136, se refiere a un artículo que analiza la correlación inversa entre miR-21 y la proteína Pcd4 supresora tumoral, que es un inhibidor de la transformación neoplásica que funciona con proteínas de muerte celular programada halladas en el cromosoma 10q24, en las células de cáncer colorrectal. Este artículo analiza la correlación entre miR-21 y la proteína Pdcf2 en las células de CCR y no tiene referencia alguna para identificar pacientes con CCR que tienen una expresión disminuida de la proteína hMSH2.

Yang Yu et al: "Context-Dependent Bidirectional Regulation of the MutS Homolog 2 by Transforming Growth Factor b Contributes to Chemoresistance in Breast Cancer Cells" Molecular Cancer Research, Vol. 8 n.º 12 de octubre de 14, 2010, páginas 1633-1642 – esta publicación se refiere principalmente a TGF-β, que es tanto un supresor tumoral como un promotor tumoral y una estrategia reguladora bidireccional de MSH2 por TGF-β que implica la activación de promotores dependientes tanto de p53 como Smads y la inhibición post-transcripcional mediada por miR-21.

El documento WO 2008/008430 se refiere al uso de miR-21 para el tratamiento de CCR. Este documento afirma que una alta expresión de miR-21 es indicativa de una escasa respuesta a la quimioterapia y una escasa supervivencia. Sin embargo, este documento no correlaciona directamente el uso de miR-21 antisentido con la apoptosis por 5-fluorouracilo. Es decir, este documento no hace mención alguna a la parada de G2/M.

El documento US 2009/192102 enseña que MSH2 es un gen diana predicho de miR-21. Sin embargo, mientras que este documento divulga reducir el número de células cutáneas en la fase G2/M de la célula, no sugiere el uso de miR-21 para aumentar la parada de G2/M en el CCR. De manera similar, aunque este documento menciona 5-fluorouracil como uno de una larga lista de quimioterapias y afirma que miR-21 reduce la apoptosis en las células de cáncer de próstata, no sugiere el uso de miR-21 para aumentar la apoptosis por 5-fluorouracilo en CCR.

Sumario de la invención

- La presente invención demuestra que miR-21 selecciona como diana y regula por disminución el complejo de proteína de reconocimiento de reparación de desapareamiento (MMR) del núcleo hMSH2 y hMSH6. Los tumores colorrectales que expresan un alto nivel de miR-21 presentan una expresión reducida de proteína hMSH2. Las células que sobreproducen miR-21 muestran una parada del daño de G2/M inducido por 5-fluorouracilo (5-FU) significativamente reducida y apoptosis que es característica de defectos en el componente de MMR del núcleo. Además, estudios con xenoinjertos demuestran que la sobreexpresión de miR-21 reduce drásticamente la eficacia terapéutica de 5-FU. Los presentes estudios muestran que la regulación por disminución del gen mutante de MMR asociada con la sobreexpresión de miR-21 puede ser un indicador clínico importante de la eficacia terapéutica en el cáncer colorrectal. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición de materia para su uso en el tratamiento de cáncer colorrectal (CCR) en un paciente que tiene expresión disminuida de proteína hMSH2 (complejo de proteína de reconocimiento de reparación de desapareamiento (MMR)) y que responde más al tratamiento con 5-fluorouracilo, comprendiendo la composición: una cantidad efectiva de miR-21 antisentido y una formulación farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que miR-21 tiene la SEQ ID. No. 12. El miR-21 antisentido puede comprender un ácido nucleico bloqueado (LNA). Preferiblemente, el paciente tiene al menos una afección seleccionada del grupo que consiste en: cáncer colorrectal resistente a 5-fluorouracilo primario, cáncer colorrectal resistente a 5-fluorouracilo adquirido, cáncer colorrectal en estadio II y cáncer colorrectal en estadio III.
- En el presente documento se divulgan composiciones de materia que comprenden al menos un miARN anti-sentido y al menos una composición adicional, en las que el miARN anti-sentido es miR-21 y puede regular por disminución al menos una proteína de MMR del núcleo, y en las que la al menos una composición adicional es útil para tratar la enfermedad relacionada con MMR. Preferiblemente, la al menos una composición adicional se selecciona del grupo que consiste en: un fármaco quimioterápico; una célula madre; AG1478; gefitinib (Iressa); erlotinib (Tarceva); cetuximab; panitumab; zalutumamab; nimotuzamab; matuzumab; y lapatinib. Preferiblemente, la al menos una proteína de MMR del núcleo se selecciona del grupo que consiste en: hMSH1; hMSH6; y hMLH1.
- En el presente documento se divulgan composiciones de materia que comprenden miR-21 antisentido y 5-fluorouracilo, o formulaciones farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- En el presente documento se divulgan composiciones de materia que comprenden miR-21 antisentido y medios para aumentar el homólogo humano 2 de MutS, o formulaciones farmacéuticamente aceptables del mismo.
- En el presente documento se divulgan composiciones de materia que comprenden miR-21 antisentido y un compuesto para el tratamiento del cáncer colorrectal, o formulaciones farmacéuticamente aceptables del mismo.
- En el presente documento se divulgan composiciones de materia que comprenden miR-21 sentido o antisentido y un análogo de pirimidina.
- En el presente documento se divulgan composiciones de materia en las que el análogo de pirimidina es 5-fluorouracilo.
- [borrado]
- En el presente documento se divulgan medios para identificar el estado de expresión de hMSH2.
- En el presente documento se divulgan kits en los que los medios para identificar el estado de expresión de hMSH2 es un anticuerpo.
- En el presente documento se divulgan kits que comprenden además instrucciones para seleccionar compuestos de prueba como tratamientos potenciales para el cáncer.
- En el presente documento se divulgan métodos para afectar al menos una célula humana, que comprenden introducir en al menos una célula que subexpresa hMutSH2 una cantidad que disminuye la subexpresión de miR-21 antisentido.
- También en el presente documento se divulgan métodos en los que la al menos una célula que subexpresa hMutSH2 es al menos una célula de cáncer colorrectal.
- También en el presente documento se divulgan métodos en los que la al menos una célula que subexpresa hMutSH2 está presente *in vitro*.
- También en el presente documento se divulgan métodos en los que la al menos una célula que subexpresa hMutSH2 está presente *in situ*.
- También en el presente documento se divulgan métodos en los que la al menos una célula que subexpresa

hMutSH2 está presente *in vivo*.

También en el presente documento se divulgan métodos que dan como resultado la apoptosis de la al menos una célula que subexpresa hMutSH2.

5 También en el presente documento se divulgan métodos en los que la al menos una célula que subexpresa hMutSH2 es muchas células que forman un tumor.

10 También en el presente documento se divulgan métodos en los que el tumor ha disminuido de tamaño tras la introducción del miR-21 antisentido.

También en el presente documento se divulgan métodos que comprenden adicionalmente introducir 5-flurouracilo en la al menos una célula que subexpresa hMutSH2.

15 También se divulgan en el presente documento métodos que comprenden adicionalmente introducir 5-flurouracilo en la al menos una célula que subexpresa hMutSH2.

20 En el presente documento se divulgan métodos para tratar a un paciente con cáncer colorrectal resistente a análogos de pirimidina primario o adquirido, que comprenden administrar miR-21 antisentido a un paciente con cáncer colorrectal resistente a análogos de pirimidina primario o adquirido.

También en el presente documento se divulgan métodos en los que el paciente tiene hMSH2 regulada por disminución.

25 También en el presente documento se divulgan métodos que comprenden adicionalmente administrar un adyuvante o tratamiento contra el cáncer colorrectal adicional al paciente.

También en el presente documento se divulgan métodos que comprenden adicionalmente administrar 5-flurouracilo al paciente.

30 También en el presente documento se divulgan métodos para tratar a un paciente con cáncer colorrectal en estadio II o estadio III, que comprenden administrar miR-21 antisentido a un paciente con cáncer colorrectal en estadio II o estadio III.

35 También en el presente documento se divulgan métodos en los que el paciente tiene hMSH2 regulada por disminución.

También en el presente documento se divulgan métodos que comprenden adicionalmente administrar un adyuvante o tratamiento contra el cáncer colorrectal adicional al paciente.

40 También p en el presente documento se divulgan métodos que comprenden adicionalmente administrar 5-flurouracilo al paciente.

45 En el presente documento se divulgan métodos para tratar a un paciente con cáncer colorrectal, que comprenden: a.) identificar si un paciente con cáncer colorrectal tiene expresión disminuida de hMSH2, y b.) tratar al paciente con miR-21 antisentido si el paciente tiene expresión disminuida de hMSH2.

50 En el presente documento se divulgan métodos para tratar a un paciente con cáncer colorrectal, que comprenden: a.) identificar si un paciente con cáncer colorrectal tiene expresión disminuida de hMSH2 en comparación con el control, y b.) tratar al paciente con miR-21 antisentido si el paciente tiene expresión disminuida de hMSH2.

55 En el presente documento se divulgan métodos para tratar a un paciente con cáncer colorrectal, que comprenden: a.) identificar si un paciente con cáncer colorrectal tiene expresión disminuida de hMSH2 en comparación con el control, b.) identificar si el paciente con cáncer colorrectal tiene expresión aumentada de miR-21 en comparación con el control, y c.) tratar al paciente con miR-21 antisentido si el paciente tiene expresión aumentada de miR-21 y expresión disminuida de hMSH2 en comparación con el control.

En el presente documento se divulgan métodos identificar compuestos útiles, que comprenden

60 a.) introducir un compuesto de prueba y miR-21 antisentido y/o sentido en células que expresan hMSH2, y b.) identificar compuestos de prueba útiles para afectar células que expresan hMSH2.

65 En el presente documento se divulgan métodos para identificar el estado de muestras de células cancerosas, que comprenden: a.) correlacionar el estado de hMSH2 y miR-21 en una muestra de prueba de células con control, y b.) identificar el estado de muestras de células cancerosas.

En el presente documento se divulgan métodos para predecir el estado de muestras de células de cáncer colorrectal, que comprenden: a.) correlacionar el estado de hMSH2 y miR-21 en una muestra de prueba que contienen células de cáncer colorrectal con control, y b.) predecir el estado de muestras de células de cáncer colorrectal.

5 En el presente documento se divulgan métodos para identificar el estado de cáncer de un organismo, que comprenden: a.) correlacionar el estado de hMSH2 y miR-21 en una muestra de prueba derivada del organismo con control, y b.) identificar el estado del organismo.

10 En el presente documento se divulgan métodos para predecir el estado del cáncer colorrectal de un organismo, que comprenden: a.) correlacionar el estado de hMSH2 y miR-21 en una muestra de prueba derivada del organismo con control, y b.) identificar el estado de cáncer colorrectal del organismo.

15 En el presente documento se divulgan métodos para inhibir la parada de G2/M y la apoptosis en células de cáncer colorrectal resistentes a 5-fluorouracilo, que comprenden introducir en células de cáncer colorrectal resistentes a 5-fluorouracilo una cantidad de miR-21 antisentido que inhibe la parada de G2/M y la apoptosis.

20 En el presente documento se divulgan métodos para inhibir la inflamación en células de cáncer colorrectal resistentes a 5-fluorouracilo, que comprenden introducir en células de cáncer colorrectal resistentes a 5-fluorouracilo una cantidad de miR-21 antisentido inhibidora de la inflamación.

Diversos aspectos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferida, cuando se lea a la luz de los dibujos adjuntos.

25 Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1D. MSH2 y MSH6 son dianas directas de miR-21.

30 Figura 1A: se muestran regiones semilla predichas de miR-21 (SEQ ID NOS 12 y 14, respectivamente) en hMSH2 (SEQ ID NO: 11) y hMSH6 (SEQ ID NO: 13) 3'UTR.

Figura 1B: Colo-320DM y SW620 se transfectaron transitoriamente con miR-21, miR codificado, ARNip anti-MSH2 o anti-MSH6 durante 48 horas. Se analizó la expresión del ARNm de hMSH2 y hMSH6 mediante PCR en tiempo real.

35 Figura 1C: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la regulación por disminución dependiente de miR-21 tanto de hMSH2 como de hMSH6. Las transfecciones fueron similares a (Figura 1B).

40 Figura 1 D: HCT-116, SW480 y RKO que contienen altos niveles endógenos de células de miR-21 se transfectaron con un anti-miR-21 o anti-miR control de LNA durante 48 horas seguido de análisis de inmunotransferencia de tipo Western de proteína E de hMSH2 y hMSH6: hMSH2 y hMSH6 3'UTR se subclonaron en sentido 3' de los genes de luciferasa (MSH2-Luc-WT y MSH6-Luc-WT respectivamente) así como hMSH2 y hMSH6 3'UTR que contiene una delección en el sitio diana de miR-21 (MSH2-Luc-mutante y MSH6-Luc-mutante) respectivamente y se co-transfectaron con miR-21 o miR codificado. La actividad luciferasa se registró tras 24 horas. Los datos representan la media y la D.E. de al menos 3 determinaciones de 4 transfecciones independientes. * p < 0,01.

45 **Figuras 2A. La expresión de la proteína del núcleo hMSH2 de MMR está inversamente correlacionada con la expresión de mir-21 en muestras de CCR.**

50 Figura 2A: Se incubaron tejidos de CCR fijados en formalina, incrustados en parafina, con una sonda de LNA anti-miR-21 o sonda codificada así como anticuerpo IHC frente a hMSH2. Se capturaron fotografías representativas con el sistema de software Nuance. Se muestran las muestras de CCR en las que la tinción fue positiva tanto para miR-21 como para hMSH2. La tinción de color azul y rojo identifica miR-21 y la proteína hMSH2 respectivamente.

55 Figura 2B: Se extrajeron ARN y proteínas de tejidos colorrectales humanas congelados recientes. Se evaluó la expresión de miR-21 mediante transferencia de tipo Northern, y la expresión de proteínas de MMR mediante inmunotransferencia de tipo Western en una serie de CCR humano.

Figura 3. miR-21 inhibe la apoptosis inducida por 5-FU *in vitro*.

60 Se sincronizaron células SW620 y Colo-320DM en G0-G1 mediante privación de suero durante 48 horas. Las células se tripsinizaron entonces, se contaron, se transfectaron con miR codificado, miR-21, ARNip anti-MSH2 o ARNip-control, y volvieron a sembrar en placa en medio que contiene FBS al 10 %. Se añadió 5-FU a las 16 h después de la liberación, correspondiente a un momento justo antes de la entrada en la fase S pero después del punto de control del ciclo celular de G1-S mediado por p53. El ciclo celular se analizó 48 horas después de la administración de 5-FU. Se muestran la cuantificación del porcentaje de G2/M detenido y células apoptóticas (sub-G1) y representan la media y la D.E. de 3 transfecciones independientes. * p < 0,001.

65 **Figura 4. La resistencia a 5-FU mediada por miR-21 es dependiente de la modulación por disminución de hMSH2.** Se sincronizaron células Lovo(MSH2+) y Lovo(MSH2-) en G0-G1 mediante privación de suero durante

48 horas y se transfectaron con miR-control, miR-21, ARNip anti-MSH2, ARNip-control, junto con vectores que codifican para ADNc de hMSH2 de longitud completa (con o sin región semilla de miR-21). El ciclo celular se analizó 48 horas tras la administración de 5-FU. La cuantificación del porcentaje de G2/M detenido y células apoptóticas (sub-G1) tanto en células Lovo(MSH2+) (barras azules) como en células Lovo(MSH2-) (barras rosas) se muestran y representan la media y la D.E. de 2 determinaciones de 3 experimentos independientes (* p < 0,001).

Figuras 5A-5C. miR-21 provoca resistencia a 5-FU *in vivo*. Se infectaron de manera estable células Lovo(MSH2+) con un vector lentiviral que codifica o bien para miR-21 o bien ARNip anti-MSH2. Como control, se infectaron células Lovo(MSH2+) y Lovo(MSH2-) con vectores vacíos. Se inyectaron ratones atímicos con Lovo (MSH2+)-vacío (n=6), Lovo(MSH2+)-miR-21 (n=6), Lovo(MSH2+)-anti-MSH2 (n=6) y Lovo(MSH2-)-vacío (n=6). Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen palpable, se administró 5-FU mediante inyección intraperitoneal durante 5 días consecutivos de una semana durante 2 semanas (zona gris). El volumen tumoral se midió antes del tratamiento y luego una vez a la semana. El volumen tumoral relativo individual (RTV) se calculó tal como sigue $RTV = Vx/V1$ donde Vx es el volumen en milímetros cúbicos en un instante dado y V1 es el volumen al inicio del tratamiento. Los resultados se expresan como el porcentaje medio de cambio en el volumen tumoral para cada grupo de ratones con D.E.

Figura 5A: Análisis de tipo Western de la expresión de proteína hMSH2 en tumores extirpados.

Figura 5B: Xenoinjertos tumorales representativos en la semana 6.

Figura 5C: Crecimiento tumoral durante y tras tratamiento con 5-FU.

Figuras 6A-6B.

Figura 6A: Colo-320DM y SW620 se transfectaron transitoriamente con miR-21, miR codificado, ARNip anti-MSH2 o anti-MSH6 durante 48 horas. La expresión de miR-21 se evaluó mediante PCR en tiempo real.

Figura 6B: La expresión de proteína se midió mediante análisis densitométrico. Las barras representan la media y la D.E. de 3 experimentos. *P<0,05.

Figuras 7A-7C.

Se transfectaron células HCT-116, SW480 y RKO con un LNA en controles de LNA o miR-21 (anti-miR-21). 48 horas después de la transfección, se recogieron las células y se recogieron ARN y proteínas.

Figura 7A: expresión de miR-21 analizada mediante PCR en tiempo real en células transfectadas con anti-miR-21 en comparación con los controles.

Figura 7B: La expresión de proteína se midió mediante análisis densitométrico.

Figura 7C: Análisis de PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de hMSH2 y hMSH6. Las barras representan la media y la D.E. de 3 experimentos. *P<0,05.

Figura 8.

Gráfico de dispersión y curva de regresión más intervalo de confianza (rojo) de casos que presentan alta expresión de miR-21 y baja expresión de hMSH2.

Se analizó miR-21 mediante transferencia de tipo Northern y hMSH2 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western en tejido adyacente tumoral y normal. En el gráfico miR-21 y hMSH2 se expresan como la razón entre tejido tumoral y tejido normal. La correlación es -0,81, intervalo de confianza del 95 %: de -0,96 a -0,25, p<0,02.

Figura 9.

Se sincronizaron células SW620 y Colo-320DM en G0-G1 mediante privación de suero durante 48 horas. Las células se tripsinizaron, se contaron, se transfectaron con miR codificado, miR-21, ARNip anti-MSH2 o ARNip-control, y se volvieron a sembrar en placa en medio que contiene FBS al 10 %. Se añadió 5-FU (50 ug/ml) a las 16 h tras la liberación, correspondiente al momento justo antes de la entrada en la fase S pero después del punto de control del ciclo celular de G1-S mediado por p53. El porcentaje de células apoptóticas se analizó mediante análisis de FACS tras 48 horas tras tinción con yoduro de propidio y anexina V. Los diagramas que muestran el porcentaje de G2/M parado y células apoptóticas (sub-G1). Los datos representan la media y la D.E. de al menos 3 experimentos independientes. * p < 0,01.

Breve descripción del listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado a través de la web EFS y se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. La copia ASCII, creada el 7 de noviembre de 2011, se denomina 53-52535_SEQ_LIST_OSURF 11085.txt, y tiene un tamaño de 3.139 bytes.

Nombre de Cebador	Cebador Fw 5'-3'	Cebador Rv 5'-3'
SEQ ID NOS 1 y 6 <i>hMSH2-LUC-WT</i>	CAGAAAGCCCTGGAAGCTTGA	TCAATTGCAAACAGTCCTCAG
SEQ ID NOS 2 y 7 <i>hMSH2-LUC-MUTANTE</i>	TTTCCATAGTGTTAACTGTCAGTGC	TCAATTGCAAACAGTCCTCAG

SEQ ID NOS 3 y 8	CCCAGTAATGGAATGAAGGGTCTG TAATAGTTTTATATTG	CAATATAAAACTATTACAGACCCTTCATT CCATTACTGGG
<i>hMSH2-ADNc-Mutante</i>		
SEQ ID NOS 4 y 9 <i>hHSH6-LUC-WT</i>	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	TAGCTTTTCTCCCCATT
SEQ ID NOS 5 y 10 <i>hMSH6-LUC-MUTANTE</i>	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	CCACCTTTGTCAGAAGTCAACTC

Descripción detallada de la invención

5 MiR-21 se sobreexpresa comúnmente en varios tumores humanos incluyendo el cáncer colorrectal. En los últimos años, se han identificado varias dianas de supresor tumoral de miR-21 que pueden acelerar la progresión del cáncer. Los inventores en el presente documento descubrieron una relación inversa entre células de tumor colorrectal que sobreexpresan miR-21 y aquellas que expresan la proteína supresora tumoral hMSH2. Además, los inventores determinaron que miR-21 parece dirigir directamente la 3'-UTR tanto del ARNm de hMSH2 como de hMSH6 dando como resultado una regulación por disminución significativa de la expresión de proteína.

10 El tratamiento terapéutico del estado de la técnica del cáncer colorrectal incluye 5-fluorouracilo (5-FU). 5-FU ejerce sus efectos citotóxicos mediante la mala incorporación de fluoronucleótidos en ARN y ADN así como la inhibición de la síntesis de nucleótidos seleccionando como diana al enzima timidilato sintetasa (TS). La sobreexpresión de TS, defectos en el metabolismo de 5-FU, mutaciones de TP53 y el deterioro del sistema de MMR son todos ellos marcas distintivas de la resistencia a 5-FU y predictores del resultado clínico. Más recientemente, tanto análisis de expresión génica y microARN han revelado un mayor nivel de complejidad en la predicción del beneficio de 5-FU en pacientes con CCR en estadio II y III que se sometieron a quimioterapia adyuvante. De hecho, un análisis retrospectivo de pacientes con CCR en estadio II y III tratados con análogos de 5-FU mostró una supervivencia reducida en pacientes con alta expresión de miR-21. Los mismos hallazgos se confirmaron en el subgrupo de pacientes con CCR en estadio III solo, mientras que los pacientes con CCR en estadio II no mostraron una correlación estadísticamente significativa. El bajo número de pacientes puede explicar este último resultado. Las células con defectos genéticos o epigenéticos de la maquinaria de MMR parecen tolerar los metabolitos de 5-FU como resultado de defectos en la parada de G2/M y la apoptosis.

25 Se ha mostrado que la regulación por disminución de hMSH2 mediante miR-21 induce resistencia a 5-FU tanto en un modelo celular como en un modelo tumoral de xenoinjerto. Tomados conjuntamente, los presentes resultados muestran que es probable que el estado tumoral de miR-21 sea un indicador importante de la eficacia terapéutica de 5-FU.

30 miR-21 parece regular varios genes supresores tumorales y del ciclo celular. Se muestra también que la regulación por disminución de hMSH2 desempeña un papel central en el desarrollo de resistencia a 5-FU. De hecho, la inhibición de apoptosis inducida por 5-FU y la parada de G2/M mediante miR-21 era comparable con la provocada por inhibición selectiva mediada por ARNip de hMSH2. Además, la transfección de células Lovo (MSH2-) con miR-21 no alteró la parada del ciclo celular o la apoptosis, demostrando que los efectos inducidos por miR-21 eran dependientes de la expresión de hMSH2. Tomados conjuntamente, los presentes resultados muestran que la inhibición de miR-21 representa un tratamiento sinérgico para superar la resistencia a 5-FU.

40 La presente invención también muestra que regulación por disminución dependiente de miR-21 de hMSH2-hMSH6 es responsable de la resistencia a 5-FU tanto primaria como adquirida. En la práctica clínica, 5-FU se administra habitualmente como infusión continua a lo largo de un periodo de 48 horas. De forma interesante, la expresión de miR-21 parece aumentar en líneas celulares expuestas continuamente a 5-FU. A la luz de la presente invención, los inventores sostienen que esta sobreexpresión puede ser un mecanismo secundario de resistencia y que las células adquieren la sobreexpresión de miR-21 para superar la citotoxicidad de 5-FU. Existe una relevancia clínica adicional si se considera que hMSH2 está frecuentemente regulado por disminución tras quimioterapia primaria incluyendo 5-FU o cisplatino en cánceres rectales y de ovario.

50 En resumen, los inventores han mostrado que la resistencia a fármacos de 5-FU en tumores colorrectales debido a la sobreexpresión de miR-21 regula por disminución directamente las proteínas de MMR del núcleo hMSH2 y hMSH6, conduciendo, en última instancia, a un defecto en la parada de G2/M inducida por daño y la apoptosis.

Definiciones y Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARNm	ARN mensajero
55 PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pre-miARN	microARN precursor
qRT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa
ARN	ácido ribonucleico

Ha de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y solo explicativas y no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario.

- 5 A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en Biología Molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

- 15 Terapia adyuvante: Un tratamiento usado en combinación con un tratamiento primario para mejorar los efectos del tratamiento primario.

20 Resultado clínico: Se refiere al estado de salud de un paciente tras el tratamiento para una enfermedad o trastorno o en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos incluyen, pero no se limitan a, un aumento en el periodo de tiempo hasta la muerte, una disminución en el periodo de tiempo hasta la muerte, un aumento en las probabilidades de supervivencia, un aumento en el riesgo de muerte, supervivencia, supervivencia libre de enfermedad, enfermedad crónica, metástasis, enfermedad avanzada o agresiva, recurrencia de enfermedad, muerte, y respuesta favorable o escasa a la terapia.

- 25 Disminución en la supervivencia: Tal como se usa en el presente documento, "disminución en la supervivencia" se refiere a una disminución en el periodo de tiempo antes de la muerte de un paciente, o un aumento en el riesgo de muerte para el paciente.

30 Detectar el nivel de expresión: Por ejemplo, "detectar el nivel de expresión de miR o miARN " se refiere a cuantificar la cantidad de miR o miARN presente en una muestra. Detectar la expresión del miR específico, o cualquier microARN, puede conseguirse usando cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento, tal como mediante qRT-PCR. Detectar la expresión de miR incluye detectar la expresión de o bien una forma madura de miARN o bien una forma precursora que está correlacionada con la expresión de miARN. Normalmente, los métodos de detección de miARN implican la detección específica de secuencia, tal como mediante RT-PCR. Pueden diseñarse sondas y cebadores específicos de miR usando el precursor y secuencias de ácido nucleico de miR maduro, que se conocen en la técnica y proporcionados en el presente documento como en las SEQ ID NO.

40 MicroARN (miARN): Moléculas ARN monocatenario que regulan la expresión génica. Los microARN son generalmente 21-23 nucleótidos de longitud. Los microARN se procesan a partir de transcritos primarios conocidos como pri-miARN para dar estructuras de lazo de tallo corto denominadas (pre)-miARN precursor y, finalmente para dar microARN maduro, funcional. Las moléculas de microARN maduro son parcialmente-complementarias a una o más moléculas de ARN mensajero, y su función primaria es regular por disminución la expresión génica. Los microARN regulan la expresión génica a través de la ruta del ARNi.

45 Expresión de miR: Tal como se usa en el presente documento, "baja expresión de miR" y "alta expresión de miR" son términos relativos que se refieren al nivel de miARN hallado en una muestra. La baja y alta expresión de miR se determina mediante comparación de los niveles de miARN en un grupo de muestras control y muestras de prueba. La baja y alta expresión puede entonces asignarse a cada muestra basándose en si la expresión de miR en una muestra está por encima (alta) o por debajo (baja) del promedio o la mediana del nivel de expresión de miR. Para muestras individuales, la alta o baja expresión de miR puede determinarse mediante comparación de la muestra con una muestra control o de referencia que se sabe que tiene una alta o baja expresión, o mediante comparación con un valor estándar. La baja y alta expresión de miR puede incluir la expresión de o bien las formas precursoras o maduras de miARN, o ambas.

55 Paciente: Tal como se usa en el presente documento, el término "paciente" incluye seres humanos y animales no humanos. El paciente preferido para el tratamiento es un ser humano. "Paciente" y "sujeto" se usan de forma intercambiable en el presente documento.

60 Vehículos farmacéuticamente aceptables: Los soportes (vehículos) farmacéuticamente aceptables útiles en esta descripción son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más compuestos, moléculas o agentes terapéuticos.

65 En general, la naturaleza del portador dependerá del modo de administración particular que se está empleando. Por ejemplo, las formulaciones parenterales comprenden habitualmente fluidos inyectables que incluyen fluidos

farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas en polvo, píldora, comprimido o cápsula), portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que van a administrarse pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, agentes de tamponamiento de pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.

5
10 Prevenir, tratar o mejorar una enfermedad: "Prevenir" una enfermedad se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad. "Tratar" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o estado patológico después de este ha comenzado a desarrollarse. "Mejorar" se refiere a la reducción en el número o la gravedad los signos o síntomas de una enfermedad.

15 Selección: Tal como se usa en el presente documento, "selección" se refiere al proceso usado para evaluar e identificar agentes candidatos que afecten a tal enfermedad. La expresión de un microARN puede cuantificarse usando una cualquiera de un número de técnicas conocidas en la técnica y que se describen en el presente documento, tales como mediante análisis de micromatriz o mediante qRT-PCR.

20 Molécula pequeña: Una molécula, normalmente con un peso molecular inferior a aproximadamente 1000 Daltons, o, menos de aproximadamente 500 Daltons, siendo la molécula capaz de modular, en cierto alcance medible, una actividad de una molécula diana.

Terapéutica: Un término genérico que incluye tanto diagnóstico como tratamiento.

25 Agente terapéutico: Un compuesto químico, molécula pequeña u otra composición, tal como un compuesto antisentido, anticuerpo, inhibidor de proteasa, hormona, quimiocina o citocina, que puede inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra apropiadamente a un sujeto.

30 Tal como se usa en el presente documento, un "agente candidato" o "compuesto de prueba" es un compuesto seleccionado para la selección para determinar si puede funcionar como agente terapéutico. "Incubar" incluye una cantidad de tiempo suficiente para que un agente interacte con una célula o tejido. "Poner en contacto" incluye incubar un agente en forma sólida o en forma líquida con una célula o tejido. "Tratar" una célula o tejido con un agente incluye poner en contacto o incubar el agente con la célula o tejido.

35 Cantidad terapéuticamente efectiva: Una cantidad de un agente farmacéutico o terapéutico especificado suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto, o en una célula, que se trata con el agente. La cantidad efectiva del agente dependerá de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse al sujeto o las células que se están tratando, y la manera de administración de la composición terapéutica.

40 En algunos métodos descritos en el presente documento, es deseable el uso de un control. A este respecto, el control puede ser una muestra de tejido no canceroso obtenida del mismo paciente, o una muestra de tejido obtenida de un sujeto sano, tal como un donante de tejido sano. En otro ejemplo, el control es patrón calculado a partir de valores históricos. Las muestras de tumor y muestras de tejido no canceroso pueden obtenerse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las muestras de tumor y no cancerosas pueden obtenerse a partir de pacientes con cáncer que se han sometido a resección, o pueden obtenerse mediante extracción usando una aguja hipodérmica, mediante microdissección, o mediante captura láser. Las muestras control (no cancerosas) pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de un cadáver donante o de un donante sano.

50 Preferiblemente, la selección comprende poner en contacto los agentes candidatos/compuestos de prueba con las células. Las células pueden ser células primarias obtenidas de un paciente, o las células pueden ser células inmortalizadas o transformadas.

El agente candidato/compuestos de prueba pueden ser cualquier tipo de agente, tal como una proteína, péptido, molécula pequeña, anticuerpo o ácido nucleico. Preferiblemente, el agente candidato es una citocina. Preferiblemente, el agente candidato es una molécula pequeña. La selección incluye tanto la selección de alto rendimiento como la selección de grupos individuales o pequeños de agentes candidatos.

Detección de microARN

60 En algunos métodos en el presente documento, es deseable identificar los miARN presentes en una muestra.

Las secuencias de microARN precursores (pre-miARN) y miARN maduros se encuentran disponibles públicamente, tal como a través de la base de datos miRBase, disponible en línea por el Sanger Institute (véase Griffiths-Jones et al., Nucleic Acids Res. 36:D154-D158, 2008; Griffiths-Jones et al., Nucleic Acids Res. 34:D140-D144, 2006; y Griffiths-Jones, Nucleic Acids Res. 32:D109-D111, 2004). Las secuencias de las formas precursoras y maduras de los miembros de la familia preferidos descritos en este momento se proporcionan en el presente documento.

La detección y cuantificación de la expresión de ARN puede lograrse mediante uno cualquiera de un número de métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente de los Estados Unidos con números 2006/0211000 y 2007/0299030.) y que se describen a continuación. Usando las secuencias conocidas para miembros de la familia del ARN, pueden diseñarse sondas y cebadores específicos para su uso en los métodos de detección que se describen a continuación según sea apropiado.

En algunos casos, el método de detección de ARN requiere el aislamiento de ácido nucleico a partir de una muestra, tal como una muestra celular o de tejido. Los ácidos nucleicos, incluyendo ARN y específicamente miARN, pueden aislarse usando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, la extracción a base de fenol es un método común para el aislamiento de ARN. Los reactivos a base de fenol contienen una combinación de desnaturizantes e inhibidores de ARNasa para la disrupción celular y tisular y posterior separación de ARN de los contaminantes. Los procedimientos de aislamiento a base de fenol pueden recuperar especies de ARN en el intervalo de 10-200 nucleótidos (por ejemplo, miARN precursores y maduros, ARN ribosómico 5S y 5.8S (ARNr), y ARN nuclear pequeño U1 (ARNnp)). Además, procedimientos de extracción tales como aquellos que usan TRIZOL™ o TRI REAGENT™, purificarán todos los ARN, grandes y pequeños, y son métodos eficientes para aislar el ARN total de muestras biológicas que contienen miARN y ARN de interferencia pequeños (ARNip).

En algunos casos, es deseable el uso de una micromatriz. Una micromatriz es una matriz microscópica, ordenada, de ácidos nucleicos, proteínas, moléculas pequeñas, células u otras sustancias que permite el análisis paralelo de muestras bioquímicas complejas. Una micromatriz de ADN consiste en diferentes sondas de ácido nucleico, conocidas como sondas de captura que están unidas químicamente a un sustrato sólido, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla de tamaño microesfera. Las micromatrices pueden usarse, por ejemplo, para medir los niveles de expresión de grandes números de ARN mensajeros (ARNm) y/o miARN simultáneamente.

Las micromatrices pueden fabricarse usando varias tecnologías, incluyendo impresión con agujas de punta fina sobre portaobjetos de vidrios, fotolitografía usando máscaras prefabricadas, fotolitografía usando dispositivos de microespejo dinámicos, impresión por chorro de tinta, o electroquímica sobre matrices de microelectrodos.

El análisis de micromatriz de miARN, por ejemplo (aunque estos procedimientos pueden usarse en forma modificada para cualquier análisis de ARN) puede conseguirse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2008/054828; Ye et al., Nat. Med. 9(4):416-423, 2003; Calin et al., N. Engl. J. Med. 353(17):1793-1801, 2005.). En un ejemplo, se extrae ARN de una muestra celular o de tejido, se seleccionan por tamaños los ARN pequeños (ARN de 18-26 nucleótidos) del ARN total usando electroforesis en gel de poli(acrilamida) desnaturizante. Los ligadores de oligonucleótido se unen a los extremos 5' y 3' de los ARN pequeños y los productos de ligación resultantes se usan como moldes para una reacción de RT-PCR con 10 ciclos de amplificación. El cebador de PCR de hebra sentido tiene un fluoróforo unido a su extremo 5', marcando de ese modo con fluorescencia la hebra sentido del producto de PCR. El producto de PCR se desnaturiza y entonces se hibrida con la micromatriz. Un producto de PCR, denominado como el ácido nucleico diana que es complementario a la secuencia de sonda de captura de miARN correspondiente sobre la matriz hibridará, a través de emparejamiento de bases, en el punto en el que las muestras de captura están fijadas. El punto fluorecerá entonces cuando se excite usando un escáner láser de micromatriz. La intensidad de fluorescencia de cada punto se evalúa entonces en términos del número de copias de un miARN particular, usando un número de controles positivos y negativos y métodos de normalización de datos de matriz, que darán como resultado la evaluación del nivel de expresión de un miARN particular.

En un método alternativo, el ARN total que contiene la fracción ARN pequeño (incluyendo el miARN) extraído de una muestra celular o de tejido se usa directamente sin selección por tamaño de los ARN pequeños, y se marca el extremo 3' usando ARN ligasa de T4 y o bien un ligador de ARN corto marcado con fluorescencia. Las muestras de ARN se marcan mediante incubación a 30 °C durante 2 horas seguido de inactivación por calor de la ARN ligasa de T4 a 80 °C durante 5 minutos. Los miARN marcados con fluoróforo complementarios a las secuencias de sonda de captura de miARN correspondientes sobre la matriz hibridarán, a través de emparejamiento de bases, con el punto en el que las sondas de captura están fijadas. El escaneo de la micromatriz y el procesamiento de datos se llevan a cabo tal como se describió anteriormente.

Existen varios tipos de micromatrices que pueden emplearse, incluyendo micromatrices de oligonucleótidos por puntos, micromatrices de oligonucleótidos prefabricadas y matrices de oligonucleótidos largas por puntos. En las micromatrices de oligonucleótidos por puntos, las sondas de captura son oligonucleótidos complementarios a secuencias de miARN. Este tipo de matriz se hibrida normalmente con productos de PCR amplificados de ARN pequeños de seleccionados por tamaño de dos muestras que van a compararse (tales como tejido no canceroso y tejido canceroso o de muestra) que están marcados con dos fluoróforos diferentes. Como alternativa, el ARN total que contiene la fracción de ARN pequeño (incluyendo los miARN) se extrae de las dos muestras y se usa directamente sin selección por tamaños de los ARN pequeños, y se marca el extremo 3' usando ARN ligasa de T4 y ligadores de ARN corto marcados con dos fluoróforos diferentes. Las muestras pueden mezclarse e hibridarse con una única micromatriz que entonces se escanea, permitiendo la visualización de los genes de miARN regulados por incremento y regulados por disminución en un ensayo.

En las micromatrices de oligonucleótidos prefabricadas o micromatrices de un solo canal, las sondas están diseñadas para hacer coincidir las secuencias de miARN conocidos o predichos. Existen diseños comercialmente disponibles que cubren genomas completos (por ejemplo, de Affymetrix o Agilent). Estas micromatrices dan estimaciones del valor absoluto de la expresión génica y, por lo tanto, la comparación de dos estados requiere el uso de dos micromatrices separadas.

Las matrices de oligonucleótidos largas por puntos están compuestas por sondas de captura de oligonucleótido de 50 a 70-meros, y se producen mediante impresión o bien por chorro de tinta o bien robótica. Las matrices de oligonucleótidos cortas están compuestas por sondas de oligonucleótido de 20-25-meros, y se producen mediante síntesis fotolitográfica (Affymetrix) o mediante impresión robótica.

En algunos casos, es deseable el uso de RT-PCR cuantitativa. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) es una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa usada para medir rápidamente la cantidad de un producto de la reacción en cadena de la polimerasa. La qRT-PCR se usa comúnmente para el fin de determinar si una secuencia genética, tal como un miR, está presente en una muestra, y si está presente, el número de copias en la muestra. Cualquier método de PCR que puede determinar la expresión de una molécula de ácido nucleico, incluyendo un miARN, entra dentro del alcance de la presente descripción. Hay varias variaciones del método de qRT-PCR conocido en la técnica, tres de los cuales se describen a continuación.

Los métodos para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa incluyen, pero no se limitan a, a través de de electroforesis en gel de agarosa, el uso de SYBR verde (un colorante de ADN bicatenario), y el uso de una sonda indicadora fluorescente. Estos dos últimos pueden analizarse en tiempo real.

Con la electroforesis en gel de agarosa, la muestra desconocida y una muestra conocida se preparan con una concentración conocida de una sección de tamaño similar de ADN diana para su amplificación. Ambas reacciones se ejecutan durante el mismo periodo de tiempo en condiciones idénticas (preferiblemente usando los mismos cebadores, o al menos cebadores de temperaturas de hibridación similares). La electroforesis en gel de agarosa se usa para separar los productos de la reacción de su ADN original y ahorrar cebadores. Las cantidades relativas de las muestras conocidas y desconocidas se miden para determinar la cantidad de las desconocidas.

El uso de colorante SYBR verde es más preciso que el método de gel de agarosa, y puede dar resultados en tiempo real. Un colorante de unión a ADN se une a todo el ADN bicatenario recién sintetizado y se mide un aumento en la intensidad de fluorescencia, permitiendo así que se determinen las concentraciones iniciales. Sin embargo, SYBR verde marcará todo el ADN bicatenario, incluyendo cualquier producto de PCR inesperado así como dímeros de cebador, conduciendo a potenciales complicaciones y artefactos. La reacción se prepara como habitualmente, con la adición de colorante de ADN bicatenario fluorescente. La reacción se ejecuta, y se monitorizan los niveles de fluorescencia (el colorante solo fluoresce cuando está unido al ADN bicatenario). Con referencia a una muestra patrón o una curva patrón, puede determinarse la concentración de ADN bicatenario en la PCR.

El método de sonda indicadora fluorescente usa una sonda a base de ácido nucleico específica de secuencia para cuantificar únicamente la secuencia sonda y no todo el ADN bicatenario. Se lleva a cabo comúnmente con sondas a base de ADN con un indicador fluorescente y un extintor colocado en posiciones adyacentes (denominadas sondas doblemente marcadas). La estrecha proximidad del indicador con el extintor impide su fluorescencia; solo con la rotura de la sonda se detecta la fluorescencia. Este proceso depende la actividad exonucleasa en 5' a 3' de la polimerasa implicada.

La reacción PCR cuantitativa en tiempo real se prepara con la adición de la sonda doblemente marcada. Con la desnaturalización del molde de ADN bicatenario, la sonda puede unirse a su secuencia complementaria en la región de interés del ADN de molde. Cuando la mezcla de reacción de PCR se calienta para activar la polimerasa, la polimerasa empieza a sintetizar la hebra complementaria con el ADN de molde monocatenario cebado. A medida que continúa la polimerización, esta alcanza la sonda unida a su secuencia complementaria, que se hidroliza entonces debido a la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa, separando de ese modo las moléculas indicadoras fluorescentes y las moléculas extintoras. Esto da como resultado un aumento en la fluorescencia, que se detecta. Durante los ciclos térmicos de la reacción PCR en tiempo real, el aumento en la fluorescencia, a medida que se libera de la sonda doblemente marcada hidrolizada en cada ciclo de PCR se monitoriza, que permite la determinación precisa de las cantidades finales, y así iniciales, de ADN.

En algunos casos, es deseable el uso de hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* (ISH) aplica y extrapola la tecnología de la hibridación de ácidos nucleicos a nivel de la célula individual, y, en combinación con el tipo de citoquímica, inmunocitoquímica y inmunohistoquímica, permite el mantenimiento de la morfología y la identificación de marcadores celulares que van a mantenerse e identificarse, y permite la localización de secuencias en células específicas dentro de poblaciones, tales como tejidos y muestras sanguíneas. ISH es un tipo de hibridación que usa un ácido nucleico complementario para localizar una o más secuencias de ácido nucleico específicas en una porción o sección de tejido (*in situ*), o, si el tejido es suficientemente pequeño, en todo el tejido (ISH de embriones completos). ARN ISH puede usarse para evaluar los patrones de expresión en un tejido, tal como la expresión de

miARN.

Las células o tejidos de muestra se tratan para aumentar su permeabilidad para permitir que una sonda, tal como una sonda específica de miARN, entre en las células. La sonda se añade a las células tratadas, se deja hibridar a la temperatura pertinente, y se elimina por lavado la sonda en exceso. Una sonda complementaria se marca con una etiqueta radioactiva, fluorescente o antigénica, de modo que la ubicación y la cantidad de la sonda en el tejido puede determinarse usando autorradiografía, microscopía de fluorescencia o inmunoensayo. La muestra puede ser cualquier muestra tal como se describe en el presente documento, tal como una muestra de tejido no canceroso o canceroso. Puesto que las secuencias de los miembros de la familia de miR-155 son conocidos, las sondas de miR-155 pueden diseñarse por consiguiente de modo que las sondas se unan específicamente a miR-155.

En algunos casos, es deseable el uso de PCR *in situ*. La PCR *in situ* es la amplificación a base de PCR de las secuencias de ácido nucleico diana antes de ISH. Para la detección de ARN, se introduce una etapa de transcripción inversa intracelular para generar ADN complementario a partir de moldes de ARN antes de PCR *in situ*. Esto permite la detección de secuencias de ARN de copia baja.

Antes de la PCR *in situ*, las células o muestras de tejido se fijan y se permeabilizan para preservar la morfología y permiten el acceso de los reactivos de PCR a las secuencias intracelulares que van a amplificarse. La amplificación por PCR de secuencias dianas se realiza a continuación o bien en células intactas colocadas en suspensión o directamente en preparaciones de citocentrífuga o secciones de tejido sobre portaobjetos de vidrios. En el enfoque anterior, las células fijadas suspendidas en la mezcla de reacción de PCR se ciclan térmicamente usando cicladores térmicos convencionales. Tras la PCR, las células se citocentrifugan sobre portaobjetos de vidrios con visualización de productos de PCR intracelulares mediante ISH o inmunohistoquímica. La PCR *in situ* sobre portaobjetos de vidrios se realiza cubriendo las muestras con la mezcla de PCR bajo un cubreobjetos que entonces se sella para prevenir la evaporación de la mezcla de reacción. La ciclación térmica se consigue colocando el portaobjetos de vidrios o bien directamente encima del bloque de calentamiento de un ciclador convencional o diseñado especialmente o usando hornos de ciclación térmica.

La detección de productos de PCR intracelulares se logra generalmente mediante una de dos técnicas diferentes, RCR *in situ* indirecta mediante ISH con sondas específicas de producto de PCR, o RCR *in situ* directa sin ISH a través de detección directa de nucleótidos marcados (tales como digoxigenina-11-dUTP, fluoresceína-dUTP, 3H-CTP o biotina-16-dUTP), que se han incorporado en los productos de PCR durante la ciclación térmica.

Uso de miR expresados diferencialmente y miARN como marcadores de predicción de pronóstico y para la identificación de agentes terapéuticos. En el presente documento se divulga que ciertos patrones de expresión de miR-155, de manera análoga con indicadores de estado son predictores de pronóstico de supervivencia en ciertos pacientes. Tal como se usa en el presente documento, "mal pronóstico" se refiere en general a una disminución en la supervivencia, o en otras palabras, un aumento en el riesgo de muerte o una disminución en el tiempo hasta la muerte. Un mal pronóstico puede referirse también a un aumento en la gravedad de la enfermedad, tal como un aumento en la propagación (metástasis) del cáncer a los órganos. En el presente documento se divulgan los marcadores respectivos que muestran al menos un aumento de 1,5 veces o una disminución en la expresión con respecto al control. En otras realizaciones, un mal pronóstico se indica mediante al menos un aumento o disminución de 2 veces, al menos a 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,5 veces, o al menos de 4 veces en los marcadores con respecto a las cifras del control de tumor de tipo natural.

Métodos de selección de agentes candidatos para identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedad son bien conocidos en la técnica. Los métodos de detección de los niveles de expresión de ARN y proteínas se conocen en la técnica y se describen en el presente documento, tal como, pero sin limitarse a, análisis de micromatriz, RT-PCR (incluyendo qRT-PCR), hibridación *in situ*, PCR *in situ*, y análisis de transferencia de tipo Northern. Preferiblemente, la selección comprende un tamiz de alto rendimiento. Preferiblemente, los agentes candidatos se seleccionan individualmente.

Los agentes candidatos pueden ser cualquier tipo de molécula, tal como, pero sin limitarse a ácido nucleico moléculas, proteínas, péptidos, anticuerpos, lípidos, moléculas pequeñas, productos químicos, citocinas, quimiocinas, hormonas, o cualquier otro tipo de molécula que pueden alterar estado(s) patológicos cancerosos o bien directa o bien indirectamente.

Normalmente, un gen endógeno, miARN o ARNm se modula en la célula. La secuencia de ácido nucleico comprende al menos un segmento que es al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95 o un 100 % idéntico en la secuencia de ácido nucleico a una o más secuencias de miARN listada en la Tabla 1. La modulación de la expresión o el procesamiento de un gen endógeno, miARN o ARNm puede ser a través de la modulación del procesamiento de un ARNm, incluyendo tal procesamiento la transcripción, el transporte y/o traslación conjunta a una célula. La modulación puede efectuarse también mediante la inhibición o el aumento de la actividad de miARN con una célula, tejido u órgano. Tal procesamiento puede efectuar la expresión de un producto codificado o la estabilidad del ARNm. Una secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico modificada. En ciertos aspectos, una o más secuencias de miARN pueden incluir o comprender una nucleobase modificada o secuencia de

ácido nucleico.

Se entenderá, en los métodos divulgados en el presente documento, que una célula u otra materia biológica tal como un organismo (incluyendo pacientes) puede proporcionarse un miARN o una molécula de miARN correspondiente a un miARN particular administrando a la célula u organismo una molécula de ácido nucleico que funciona como el miARN correspondiente una vez está dentro de la célula. La forma de la molécula proporcionada a la célula puede no ser la forma en la que actúa un miARN una vez está dentro de la célula. Por lo tanto, se contempla que, la materia biológica se proporciona un miARN sintético o un miARN no sintético, tal como uno que se procesa en un miARN maduro y activo una vez ha accedido a la maquinaria de procesamiento de miARN de la célula. Se contempla específicamente que la molécula de miARN proporcionada a la materia biológica no es una molécula de miARN maduro sino una molécula de ácido nucleico que puede procesarse en el miARN maduro una vez se encuentra accesible para la maquinaria de procesamiento de miARN. El término "no sintético" en el contexto de miARN significa que el miARN no es "sintético", tal como se define en el presente documento. Además, se contempla que características divulgadas en el presente documento que se refieren al uso de miARN sintéticos, se considera divulgado también el uso de miARN no sintéticos correspondientes, y viceversa. Se entenderá que el término "proporcionar" un agente se usa para incluir "administrar" el agente a un paciente.

Los métodos divulgados en el presente documento pueden incluir también seleccionar como diana un miARN para modular en una célula u organismo. La expresión "seleccionar como diana un miARN para modular" significa que un ácido nucleico se empleará para modular el miARN seleccionado. La modulación se consigue con un miARN sintético o no sintético que corresponde al miARN seleccionado como diana, que proporciona efectivamente el miARN seleccionado como diana a la célula u organismo (modulación positiva). La modulación se consigue con un inhibidor de miARN, que inhibe de forma efectiva el miARN seleccionado como diana en la célula o el organismo (modulación negativa).

El miARN seleccionado como diana que va a modularse es un miARN que afecta a una enfermedad, afección o ruta. El miARN puede seleccionarse como diana porque un tratamiento puede proporcionarse mediante modulación negativa del miARN seleccionado como diana. Como alternativa, el miARN puede seleccionarse como diana porque un tratamiento puede proporcionarse mediante modulación positiva del miARN seleccionado como diana.

En ciertos métodos divulgados en el presente documento, hay una etapa adicional de administrar el modulador de miARN seleccionado a una célula, tejido, órgano u organismo (colectivamente "materia biológica") que necesita tratamiento relacionado con la modulación del miARN seleccionado como diana o que necesita de los resultados fisiológicos o biológicos analizados en el presente documento (tal como con respecto a una ruta celular particular o disminución como resultado en la viabilidad celular). En consecuencia, en algunos métodos divulgados en el presente documento hay una etapa de identificar un paciente que necesita tratamiento al que puede proporcionarse el/los modulador(es) de miARN. Se contempla que puede administrarse una cantidad efectiva de un modulador de miARN. En particular, hay un beneficio terapéutico conferido a la materia biológica, donde un "beneficio terapéutico" se refiere a una mejora en la una o más afecciones o síntomas asociados con una enfermedad o afección o una mejora en el pronóstico, duración o el estado con respecto a la enfermedad. Se contempla que un beneficio terapéutico incluye, pero no se limita a, una disminución en el dolor, una disminución en la morbilidad, una disminución en un síntoma. Por ejemplo, con respecto al cáncer, se contempla que un beneficio terapéutico puede ser la inhibición del crecimiento tumoral, prevención de metástasis, reducción en el número de metástasis, inhibición de la proliferación de células cancerosas, inhibición de la proliferación de células cancerosas, inducción de muerte celular en células cancerosas, inhibición de angiogénesis cerca de células cancerosas, inducción de apoptosis de células cancerosas, reducción en el dolor, reducción en el riesgo de reaparición, inducción de quimiosensibilidad o radiosensibilidad en células cancerosas, prolongación de la vida, y/o retraso de la muerte directa o indirectamente relacionada con el cáncer.

Además, se contempla que las composiciones de miARN pueden proporcionarse como parte de una terapia a un paciente, junto con terapias tradicionales o agentes preventivos. Además, se contempla que cualquier método analizado en el contexto de la terapia puede aplicarse como preventivamente, en particular en un paciente que se ha identificado que necesita potencialmente la terapia o que corre el riesgo de la afección o enfermedad para la que existe la necesidad.

Además, los métodos divulgados en el presente documento se refieren al empleo de uno o más ácidos nucleicos correspondientes a un miARN y un fármaco terapéutico. El ácido nucleico puede potenciar el efecto o la eficacia del fármaco, reducir cualquier efecto secundario o toxicidad, modificar su biodisponibilidad, y/o disminuir la dosificación o frecuencia necesarias. Preferiblemente, el fármaco terapéutico es un agente terapéutico contra el cáncer. En consecuencia, existe un método de tratamiento del cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente el agente terapéutico contra el cáncer y una cantidad efectiva de al menos una molécula de miARN que mejora la eficacia del agente terapéutico contra el cáncer o protege las células no cancerosas. Las terapias contra el cáncer también incluyen varias terapias de combinación tanto con tratamientos químicos como basados en radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, bevacizumab, cisplatino (CDDP), carboplatino, inhibidores de EGFR (gefitinib y cetuximab), procarbazona, mecloretamina, ciclofosfoamida, camptotecina, inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib) ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea,

dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina (adriamicina), bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión a receptores de estrógenos, taxol, taxotere, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la proteína farnesil transferasa, transplatino, 5-fluorouracil, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o derivado variante de lo anterior.

5 Generalmente, los de miARN puede darse para conseguir el efecto opuesto en comparación con cuando se dan moléculas de ácido nucleico correspondientes al miARN maduro. De forma similar, pueden darse moléculas de ácido nucleico correspondientes al miARN maduro para conseguir el efecto opuesto en comparación con cuando se dan los inhibidores del miARN. Por ejemplo, moléculas de miARN que aumentan la proliferación celular pueden proporcionarse en células para aumentar la proliferación o inhibidores de tales moléculas pueden proporcionarse en células para disminuir la proliferación celular. Se contempla que en el contexto de los diferentes efectos fisiológicos observados con las diferentes moléculas de miARN e inhibidores de miARN divulgados en el presente documento. Estos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes efectos fisiológicos: aumento y disminución de la proliferación celular, aumento o disminución de la apoptosis, aumento de la transformación, aumento o disminución de la viabilidad celular, reducción o aumento del número de células viables, y aumento o disminución del número de células en una fase particular del ciclo celular. En el presente documento se divulga que los métodos contemplados generalmente incluyen proporcionar o introducir una o más moléculas de ácido nucleico diferentes correspondientes a una o más moléculas de miARN diferentes. Se contempla que las siguientes, al menos las siguientes, o como máximo el siguiente número de moléculas de ácido nucleico diferentes, pueden proporcionarse o introducirse: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, o cualquier intervalo derivable del mismo. Esto se aplica también al número de moléculas de miARN diferentes que pueden proporcionarse o introducirse en una célula.

25 Ejemplos

Ejemplo 1.

30 Materiales y Métodos

Cultivos celulares y Transfección

Células de cáncer colorrectal (CCR) Colo-320DM, SW620, SW480, HCT-116 y RKO (Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC Manassas, VA) se cultivaron en RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA), y se hicieron crecer células de empacquetamiento 293TN (System Biosciences, Mountain View, CA) en DMEM (Gibco, Carlsbad, CA). Lovo+chr2hMSH2+2 y Lovo(DT40.2)- 4-1hMSH2/2 1 se hicieron crecer en IMDM (Gibco, Carlsbad, CA) que contenía G418 700 mg/ml (Gibco). Todas las células se suplementaron con suero bovino fetal al 10 % (Sigma, St. Louis, MO) más antibióticos. Las células se examinaron periódicamente para detectar contaminación del micoplasma y siempre dieron resultados negativos. Las células se transfectaron en placas de 6 pocillos mediante el uso de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Para los estudios de sobreexpresión se adquirieron miARN específico u oligonucleótidos precursores control de Ambion (Austin, TX) y se usaron a 50 nM. Se usaron Ontarget-plus ARNip para hMSH2 y hMSH6 (Dharmacon, CO) como control. Para experimentos de silenciamiento se usaron miRCURY LNA™ anti-miR-21 o sonda desactivada miRCURY control (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) a 50 nM. La expresión de miARN se verificó tras 48 horas mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe a continuación. Los plásmidos que codifican para ADNc de MSH2 de longitud completa se adquirieron de Origene. El hMSH2 mutante para la región semilla de miR-21 se preparó usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio de QuikChange (Stratagene, San Diego, CA) (Tabla 2).

TABLA 2. Lista de cebadores usados para la clonación		
Nombre de Cebador	Cebado Fw 5'-3'	Cebador Rv 5'-3'
SEQ ID NOS 1 y 6 <i>hHSH2-LUC-WT</i>	CAGAAAGCCCTGGAACCTGA	TCAATTGCAAACAGTCCTCAG
SEQ ID NOS 2 y 7 <i>hMSH2-LUC-MUTANT</i>	TTTCCATAGTGTTAACTGTCAGTGC	TCAATTGCAAACAGTCCTCAG
SEQ ID NOS 3 y 8 <i>hHSH2-ADNc-Mutante</i>	CCCAGTAATGGAATGAAGGGTCTGTA ATAGTTTTATATTG	CAATATAAACTATTACAGACCCTT CATTCCACTACTGGG
SEQ ID NOS 4 y 9 <i>hMSH6-LUC-WT</i>	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	TAGCTTTTCTCCCCATTT
SEQ ID NOS 5 y 10 <i>hMSH6-LUC-MUTANTE</i>	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	CCACCTTTGTCAGAAGTCAACTC

50 *Ensayo de luciferasa*

Los sitios de unión a miARN predichos en la 3'-UTR de hMSH2 y hMSH6 se clonaron en sentido 3' del gen de luciferasa de luciérnaga tal como sigue. Se amplificó ADN complementario (ADNc) y ADN genómico de células SW-

480 mediante PCR usando cebadores específicos para la clonación de hMSH2 y hMSH6 respectivamente (Tabla 2). El producto se digirió entonces con SpeI y SacII (New England Biolabs Ipswich, MA) y se insertó en el vector control de pGL3 (Promega, Madison, WI) previamente modificado para albergar los sitios SpeI y SacII inmediatamente en sentido 3' del codón de parada del gen de luciferasa de luciérnaga. Constructos indicadores con secuencias de reconocimiento de miARN mutado se construyeron para cada gen individual (MUT-21). Para las regiones semilla de miR-21 tanto de hMSH2 como de hMSH6, se obtuvieron constructos mutantes usando cebadores situados en sentido 5' o 3' del sitio de unión de miARN predicho con el fin de excluir los sitios complementarios de la región semilla.

10 Las células Colo-320DM y SW480 se cotransfectaron en placas de 12 pocillos con 1 µg de vector control indicador de luciferasa de luciérnaga pGL3, 0,1 µg del vector control pRL-SV40 (Promega, Madison, WI), y miARN 50 nM, precursores control, LNA frente a miR-21 o control de LNA. Se midieron las actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla consecutivamente usando el ensayo Dual Luciferase Assay (Promega) 24 horas después de la transfección.

15 Inmunotransferencia de tipo Western

Para el análisis de inmunotransferencia se lisaron células con tampón de lisis celular helado más inhibidor de proteasa (Cell Signaling Technology Inc. Danvers, MA). Se resolvieron cantidades equivalentes de proteína y se mezclaron con 4X tampón de muestra SDS-PAGE, se sometió a electroforesis en un gradiente lineal del 4 %-20 % y 7,5 % de Tris-HCL Criterion Precast Gels (Bio-Rad), y se transfirió a membranas de nitrocelulosa o PVDF (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desgrasada al 5 % en solución salina tamponada con Tris, pH 7,4, que contenía Tween 20 al 0,05 %, y se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón anti-MSH2 (1:200, Invitrogen), anticuerpo monoclonal de ratón anti-MSH6 (1:500, BD Biosciences San Jose, CA), anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina (1:5000, Sigma), anticuerpo monoclonal de ratón anti-GAPDH (1:1000, SantaCruz Biotechnology).

PCR en tiempo real para miARN maduros y genes

30 El ARN total se aisló con Trizol (Invitrogen). Los miARN maduros se evaluaron mediante el ensayo de microARN TaqMan en un solo tubo, mientras que la expresión de los ARNm de interés se evaluó mediante el ensayo de expresión génica con las siguientes sondas: hMSH2=Hs00953523_m1, hMSH6=Hs00943001_m1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La expresión de miARN se normalizó frente a la de RNU44 y RNU48. La expresión génica se normalizó frente a vinculina. Todas las reacciones de retrotranscriptasa (RT), incluyendo controles no de molde y RT menos controles, se ejecutaron en un termociclador GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems). Cada muestra se sometió a prueba por triplicado a menos que se especifique lo contrario.

Transferencia de tipo Northern

40 Para la detección de miARN maduro, se realizó transferencia de tipo Northern de acrilamida tal como se describió previamente 2.

Hibridación in situ de ácido nucleico bloqueado (LNA) de miARN de sección de tejido fijado a la formación, incrustado en parafina.

45 La detección de microARN se realizó en una matriz de tejido de cáncer de colon (US Biomax BC05118) que contenía 50 núcleos normales y de cáncer de colon por duplicado mediante hibridación *in situ* (ISH) tal como se describió previamente 3. Los controles negativos incluían la omisión de la sonda y el uso de una sonda de LNA codificada. Tras la hibridación *in situ* para los miARN, los cortes se analizaron para determinar la inmunohistoquímica usando las condiciones óptimas para hMSH2 (Ventana n.º de cat. 760-4265). Para determinar la inmunohistoquímica, los inventores usaron el sistema Ultrasensitive Universal Fast Red de Ventana Medical Systems (Tucson, AZ). Las imágenes de puntos representativos se han tomado con el sistema Nuance (Ventana). Los núcleos cancerosos se puntuaron para las proteínas de expresión miR-21 y hMSH2 basándose en el número de células positivas en el núcleo.

55 Recogida de tejido

60 Se recogieron tejidos congelados recientes de tejido tumoral y tejido adyacente normal de 83 casos consecutivos de CCR en el Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori, Meldola, Italia, tras la aprobación del comité ético. Los lisados celulares para la extracción de proteínas y ARN se extrajeron tal como se mencionó anteriormente,

Análisis del ciclo celular y análisis de apoptosis

65 Tinción con yoduro de propidio (PI): las células se separaron con tripsina, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato fría (PBS)-FCS al 5 % y entonces se fijaron en etanol al 70 % durante 24 h. Tras lavarse con PBS, las

células se incubaron con PI 1 µg/ml durante 3 h a 25 °C antes del análisis de FACS mediante el citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las células se consideraron apoptóticas cuando su contenido de ADN era <2N. Tinción con anexina V: Las células se separaron con tripsina, se lavaron con PBS-FCS al 5 % y entonces se colocaron en tampón de unión que contenía NaCl 0,14 M, CaCl₂ 2,5 mM y ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico 0,01 M (pH 7,4) a lo que se añadieron 7-amino-actinomicina D (7-AAD) y anexina V-FITC (Pharmingen, San Diego, CA) antes del análisis de FACS. Las células se consideraron apoptóticas cuando eran anexina VFITC positivas y 7-AAD negativas.

Los experimentos de sincronización se ejecutaron tal como sigue: células Lovo-MSH2 positivas, Lovo-MSH2 negativas, SW620 y Colo-320DM se sincronizaron mediante parada en G₀-G₁ a través de confluencia y tratamientos de suero bajo durante 48 horas 4, las células se disociaron entonces con tripsina, se contaron, se transfectaron con Pre-miR-control, Pre-miR-21, ARNip frente a hMSH2, ARNipcontrol y vectores que codifican para el ADNc de MSH2 de longitud completa (con o sin región semilla de miR-21) usando el kit Cell Nucleofector® (Lonza Walkersville, Inc ME) o Lipofectamine 2000TM (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se volvieron a sembrar en placa en medio que contenía FBS al 10 %. La adición de 5-fluorouracilo (50ug/ml 5) se produjo a las 16 h tras la liberación, correspondiendo al momento justo antes de la entrada en la fase S pero después del punto de control del ciclo celular G₁-S mediado por p53.

Generación de clones estables que sobreexpresan miR-21

Se infectaron de forma estable células Lovo-MSH2 positivas y Lovo-MSH2 negativas con el plásmido de expresión pCDH-CMV-MCS-EF1-miARN que contenían el miR-21 de longitud completa y el gen de GFP bajo el control de dos promotores diferentes (System Biosciences, Mountain View, CA). Se usó un vector vacío como control. Se empaquetaron los constructos control y de expresión de pre-miR-21 con la mezcla de plásmido pPACKH1 Lentivector Packaging (System Biosciences) en la línea celular de empaquetamiento 293-TN. Los virus se concentraron usando la solución de precipitación de virus PEG-it™ y se analizaron los títulos usando el kit de titulación UltraRapid Lentiviral (System Biosciences). Las células infectadas se seleccionaron mediante análisis de FACS (FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems). La eficiencia de infección >90 % se verificó mediante microscopía fluorescente y se confirmó adicionalmente mediante PCR en tiempo real para la expresión de miR-21.

Estudios de xenoinjerto.

Se realizaron estudios en animales de acuerdo con las directrices institucionales. Células Lovo MSH2-positivas infectadas con vectores lentivirales que codifican para o bien miR-21, ARNip para hMSH2 o vector vacío como control y Lovo hMSH2-negativas infectadas con vector vacío se inyectaron en el costado de ratones atímicos (5x10⁶). Cuando los xenoinjertos (6 animales para cada grupo) alcanzaron un volumen palpable, se administró 5-FU (50 mg/kg/día) mediante inyección intraperitoneal durante 5 días consecutivos a la semana durante 2 semanas. El volumen tumoral se midió al inicio del tratamiento y entonces una vez a la semana. El volumen tumoral estimado (V) se calculó mediante la siguiente fórmula: $V = W^2 \times L \times 0,5$, en la que W representa el mayor diámetro tumoral en centímetros y L representa el siguiente diámetro tumoral más grande. El volumen tumoral relativo individual (RTV) se calculó tal como sigue $RTV = V_x/V_1$ donde V_x es el volumen en milímetros cúbicos en un instante dado y V₁ es el volumen al inicio del tratamiento.

Ejemplo 2.

MiR-21 selecciona como diana directamente la proteína de expresión hMSH2 y hMSH6

El análisis in silico mostró que miR-21 podría seleccionar como diana hMSH2 y hMSH6 ARNm (TargetScan, Whitehead Institute, MIT, Fig. 1A). Los inventores identificaron sitios de unión putativos para miR-21 en la 3'-UTR tanto de hMSH2 (NCBINM_000249.2) como de hMSH6 (NCBI NM_000179.2). Los inventores examinaron el efecto de la expresión de miR-21 sobre la expresión de ARNm de hMSH2 y hMSH6 endógenas en células de CCR Colo-320DM y SW620. Ambas líneas celulares presentan una baja expresión basal de miR-21. Los inventores transfectaron estas líneas celulares con precursor de miR-21 (miR-21) o un control de precursor de miR codificado (Figura 6). La sobreexpresión de un ARN de interferencia pequeño específico (ARNip) frente a hMSH2 (anti-MSH2) o hMSH6 (anti-MSH6) no afectó a los niveles de miR-21 (Fig. 6A). Los niveles de ARNm de hMSH2 y hMSH6 no se vieron afectados por la sobreexpresión de miR-21 (Fig. 1B). Por el contrario, ARNip anti-MSH2 y anti-MSH6 redujo específicamente la expresión de ARNm de hMSH2 y hMSH6 respectivamente (Fig. 1B). Los inventores observan una reducción consistente en la expresión de ARNm de hMSH6 con el ARNip anti-MSH2. Esta reducción podría ser un resultado de degenerar la hibridación del ARNip anti-MSH2 con el ARNm de hMSH6 o estabilidad reducida de ARNm de hMSH6 resultante de compañero de proteína heterodímero disminuido hMSH2. Los presentes resultados muestran que la sobreexpresión de miR-21 no afecta a los niveles de ARNm de hMSH2 o hMSH6.

Los inventores examinaron los niveles de proteína de hMSH2 y hMSH6 tras la transfección de miR-21 en células Colo-320DM y SW620 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (Fig. 1C, Fig 6B). Las proteínas hMSH2 y hMSH6 se redujeron significativamente en células que sobreexpresan miR-21 en comparación con el miR

codificado. Los ARNip anti-MSH2 y anti-MSH6 se transfectaron en estas líneas celulares en paralelo. Los inventores observaron que las células transfectadas con miR-21 presentaban una regulación por disminución de hMSH2 y hMSH6 que parecía comparable a las células transfectadas con ARNip. A la inversa, los inventores transfectaron células CCR SW480, HCT116 y RKO que contienen altos niveles de miR-21 endógeno con un ácido nucleico
 5 bloqueado (LNA) frente a miR-21 (anti-miR-21) o un LNA codificado (control anti-miR). Los inventores encontraron que las células transfectadas con anti-miR-21 mostraban un aumento en la expresión tanto de la proteína hMSH2 como hMSH6 (Fig. 1D; Fig. 7B), mientras que no se observaron cambios en los niveles de ARNm (Fig. 7C).

La 3'UTR completa de hMSH2 o hMSH6 se subclonó en sentido 3' del gen de luciferasa. El análogo de constructo
 10 indicador de luciferasa con un miR-21 precursor (miR-21) o miR codificado se transfectó entonces en las células Colo-320DM. Los inventores observaron una reducción del 50 % y el 37 % en la actividad luciferasa con constructos que contenían las regiones semilla de miR-21 para hMSH2 o hMSH6 respectivamente ($p < 0,001$; Fig. 1E). La delección de las regiones semilla de miR-21 dio como resultado en el restablecimiento de la actividad luciferasa para los dos vectores que contienen hMSH2 o hMSH6 (Fig. 1E). Los inventores transfectaron células SW480 que
 15 presentaban altos niveles de expresión de miR-21 con un vector indicador de luciferasa que contenía la región semilla 3'-UTR de tipo salvaje (WT) o mutada (mutante) (Fig. 5I). Tal como se esperaba, los inventores encontraron que la ablación del sitio de unión de miR-21 dio como resultado una actividad luciferasa aumentada para las células transfectadas tanto con vector de hMSH2 como hMSH6. Para confirmar estas observaciones, se cotransfectaron las células SW480 con el indicador de luciferasa 3'-UTR de hMSH2 y hMSH6 más el control de anti-miR-21 o anti-miR
 20 de LNA. El silenciamiento de LNA de miR-21 indujo un aumento en la actividad luciferasa (Fig. 1F). Tomado como un todo, los presentes resultados muestran que miR-21 ejerce un efecto directo sobre la 3'-UTR de hMSH2 y hMSH6 que, en última instancia, regula la expresión de la proteína hMSH2 y hMSH6. Puesto que el estado de la proteína hMSH2 puede afectar a la estabilidad y la expresión de la proteína hMSH6 (9), los inventores no pueden excluir la posibilidad de que la regulación de miR-21 y la pérdida de proteína hMSH2 puedan contribuir a la regulación por
 25 disminución de hMSH6.

Ejemplo 3.

miR-21 está inversamente correlacionado con la proteína del núcleo de MMR hMSH2 en tejidos de CCR

30 Los inventores examinaron la expresión de miR-21 y hMSH2 en dos cohortes de CCR diferentes (Fig. 2). Una micromatriz de tejido que contenía 50 casos no seleccionados de CCR y tejido adyacente normal emparejado se hibridó con un control anti-miR-21 de o control anti-miR de LNA no específico combinado con tinción inmunohistoquímica (IHC) para la proteína hMSH2 (Fig. 2A). Una puntuación para la expresión de la proteína tanto
 35 miR-21 como hMSH2 se dio de acuerdo con el porcentaje de células positivas en el núcleo. Cuarenta y dos de cincuenta núcleos se encontraban disponibles para el análisis apareado de tejido tumoral y tejido normal pareado. Los inventores encontraron que miR-21 se regulaba por incremento en 28 (66 %) de estos casos cuando el tumor se comparaba con tejido pareado normal. 14 de 42 (33 %) casos tenían una fuerte regulación por disminución de hMSH2 en tejido tumoral en comparación con el tejido normal. En todos estos casos, se encontró que miR-21 está
 40 regulado por incremento. El análisis de correlación de Pearson en este subgrupo de pacientes mostró un valor de r de $-0,82$ ($p < 0,001$). El análisis de correlación en la cohorte completa de casos mostró un valor de r de $-0,63$. Los tejidos de CCR puntuados como positivos tanto para miR-21 como hMSH2 no mostraron una co-expresión en el mismo nido canceroso (véase la Fig. 2A, co-marcado).

45 Los inventores examinaron tumores congelados recientes de una segunda cohorte de muestras de CCR para las que se encontraban disponibles tejidos cancerosos y tejidos adyacentes normales (Fig. 2B). La expresión de miR-21 se determinó mediante análisis de tipo Northern y RT-PCR, mientras que la expresión de proteína hMSH2 se determinó mediante análisis de tipo Western. Veintiséis casos mostraron regulación por disminución de hMSH2 en tumores en comparación con el tejido adyacente normal. Se encontró que la miR-21 se había aumentado en 24 de
 50 estos casos (90 %) cuando el tumor se comparaba con tejidos normales adyacentes. Puesto que miR-155 puede afectar a la expresión de hMSH2 y otras proteínas de MMR, los inventores excluyeron estos casos que mostraban sobreexpresión simultánea de miR-155 y miR-21 (16 casos) de este análisis. Una correlación inversa ($r = -0,81$, $p < 0,02$) era aún evidente en 8 casos restantes, destacando la correlación inversa entre la sobreexpresión de miR-21 y la regulación por disminución de hMSH2 en tumores de CCR (Fig 2B; Fig 8).

Ejemplo 4.

miR-21 reduce la parada de G2/M y la apoptosis tras la exposición a 5-fluorouracilo

60 Las líneas celulares MMR-defectuosas presentan resistencia a varios fármacos terapéuticos incluyendo 5-fluorouracilo (5-FU). Los presentes estudios han demostrado que la resistencia era el resultado de una incorporación defectuosa de metabolitos de 5-FU en el ADN, conduciendo a una parada de G2/M dependiente del daño reducida y posterior apoptosis. Los inventores examinaron la parada del ciclo celular inducido por 5-FU y apoptosis en células Colo-320DM y SW620 tras la transfección de miR-21. Los inventores usaron un miR codificado como control y
 65 compararon estos resultados con una transfección similar con un ARNip anti-MSH2 (Fig.3). Los inventores encontraron que la sobreexpresión de miR-21 disminuía el porcentaje de células en sub-G1 (apoptosis) y G2/M tras

el tratamiento con 5-FU. Las células transfectadas con miR-21 presentaban una parada de G2/M reducida y una apoptosis similar a las células transfectadas con ARNip frente a hMSH2 (Fig 3). El efecto de la expresión de miR-21 sobre la apoptosis mediada por 5-FU se confirmó adicionalmente en Colo-320DM y SW620 mediante tinción con anexina V (Fig. 9). Se observó una respuesta similar en células Lovo isogénicas en las que la mutación de hMSH2 [Lovo(MSH2-)] se ha complementado con la introducción del cromosoma 2 [Lovo(MSH2+)] (Fig. 4). La sobreexpresión de miR-21, así como ARNip frente a hMSH2

Tabla 1. Análisis estadístico de experimentos *in vivo*.

reducían la acumulación de sub-G1 y G2/M en células Lovo(MSH2+) mientras que no se observó ningún efecto en células Lovo(MSH2-) (Fig 4). La co-transfección de células Lovo(MSH2+) y Lovo(MSH2-) con un plásmido que codifica para el ADNc de hMSH2 de longitud completa promovió la apoptosis inducida por 5-FU y la parada del ciclo celular. La co-transfección del mismo plásmido junto con miR-21 redujo notablemente la parada de G2/M y la apoptosis (Fig. 4). Además, la delección del sitio diana en el ADNc de hMSH2 volvió el mensaje insensible frente a la regulación de miR-21 y las células conservaron una parada de G2/M inducida por daño normal y apoptosis. Tomado como un todo, los presentes resultados son consistentes con la conclusión de que la regulación por disminución de la expresión de hMSH2 por miR-21 da como resultado una resistencia celular a 5-FU.

Ejemplo 5.

La sobreexpresión de miR-21 induce resistencia a 5-FU en un modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal

Los presentes estudios celulares muestran que miR-21 inhibe la parada de G2/M inducida por 5-FU y la apoptosis reduciendo la expresión de hMSH2. Los inventores desarrollaron un modelo de tumor de cáncer de colon de xenoinjerto en el que los inventores generaron clones estables de células Lovo(MSH2+) que sobreexpresaban miR-21 [Lovo(MSH2+)-miR-21 o un ARNip frente a hMSH2 [Lovo(MSH2+)-anti-MSH2] usando un sistema de expresión lentiviral. Las células Lovo(MSH2-) y Lovo(MSH2+) que contenían la inserción estable de un vector vacío sirvieron como controles. Las células que contenían expresión lentiviral estable se inyectaron en el costado de ratones atímicos (5x10⁶ células). Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen palpable, se administró 5-FU (50 mg/kg/día) mediante inyección intraperitoneal durante 5 días consecutivos a la semana durante 2 semanas. Los inventores confirmaron que la expresión de hMSH2 se redujo drásticamente en xenoinjertos de tumor Lovo(MSH2+) que expresaban miR-21 o el ARNip anti-MSH2 en comparación con el vector vacío (Fig. 4A).

El tratamiento con 5-FU demostró ser más eficaz con xenoinjertos de tumor Lovo(MSH2+) en comparación con xenoinjertos de tumor Lovo(MSH2-) (Fig. 5; Tabla 1). Los presentes resultados muestran que las células MMR-competentes responden mejor a la terapia con 5-FU. De manera importante, la sobreexpresión estable de miR-21 [Lovo(MSH2+)-miR-21] dio como resultado una respuesta reducida frente a 5-FU y provocó una tasa de crecimiento tumoral comparable con las de las células tumorales Lovo(MSH2+) infectadas con ARNip frente a hMSH2 [Lovo(MSH2+)-anti-MSH2] (Fig. 5; Tabla 1). Además, tras la interrupción de 5-FU (2 semanas) el crecimiento tumoral de las células infectadas con Lovo(MSH2+)-miR-21 pareció significativamente mayor en comparación con los controles; lo que muestra que la sobreexpresión de miR-21 potenciaba la progresión del cáncer. Tomados conjuntamente, los presentes resultados soportan un papel central para la regulación por disminución dependiente de miR-21 de la proteína de MMR heterodímera hMSH2-hMSH6 en la resistencia a 5-FU.

Se muestran los valores de P y se han calculado comparando cada grupo con el grupo control (Lovo(MSH2+)-vacío) usando un análisis de prueba T.

	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6
Lovo(MSH2+)-miR-21	0,136	0,008	0,026	0,040	0,048	0,035
Lovo(MSH2+)-anti-MSH2	0,183	0,019	0,049	0,004	0,080	0,159
Lovo(MSh2-)-vacío	0,186	<0,001	0,003	0,004	0,008	0,003

Ejemplo 6.

Métodos terapéuticos/profilácticos y composición

En el presente documento se divulgan métodos de tratamiento y profilaxis mediante administración a un sujeto de una cantidad efectiva de un miR-21 antisentido terapéutico, con o sin terapia de combinación. En un aspecto preferido, el agente terapéutico está sustancialmente purificado. El sujeto es preferiblemente un animal, incluyendo, pero sin limitarse a, animales tales como vacas, cerdos, gallinas, etc., y es preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano.

Se conocen diversos sistemas de administración y se usan para administrar un agente terapéutico de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, expresión mediante células recombinantes, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un

vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal y oral. Los compuestos se administran mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya.

Puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito tras cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas elásticas, o fibras. Preferiblemente, la administración es mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o tejido neoplásico o pre-neoplásico.

Preferiblemente cuando el agente terapéutico es un ácido nucleico que codifica para un agente terapéutico de proteína, el ácido nucleico se administra *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándola de modo que se vuelva intracelular, o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándola junto con un péptido de tipo homeobox que se sabe que entra en el núcleo. Como alternativa, puede introducirse un agente terapéutico de ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión, mediante recombinación homóloga.

En el presente documento se divulgan también composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente terapéutico, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un portador de este tipo incluye, pero no se limita a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. El portador y la composición pueden ser estériles. La formulación se adecuará al modo de administración.

La composición, si se desea, puede contener también cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento de pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida, o polvo. La composición puede formularse como supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

Preferiblemente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa en seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición incluye también un agente de solubilización y un anestésico local tal como lignocáina para aliviar el dolor en el sitio de inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran o bien por separado o bien mezclados entre sí en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad del agente activo. Cuando la composición ha de administrarse mediante infusión, se dispensará con una botella para infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. Cuando la composición se administra mediante inyección, se proporciona una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de modo que los ingredientes se mezclan antes de la administración.

Los agentes terapéuticos en el presente documento se divulgan formulados como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como aquellos derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como aquellos derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad del agente terapéutico divulgado en el presente documento que será efectiva en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se determina mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación dependerá también de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se decide de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa son generalmente aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación adecuados para administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis efectivas

pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelo animal.

En el presente documento se divulga un kit o paquete farmacéutico que comprende uno o más envases cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento. Opcionalmente asociado con tal(es) envase(s) está un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de fabricación, el uso o la venta para la administración en seres humanos.

Ejemplo 7.

Método de tratamiento de pacientes con cáncer.

Este ejemplo describe un método de selección y tratamiento de pacientes que es probable que tengan una respuesta favorable a tratamientos con composiciones en el presente documento.

Un paciente al que se ha diagnosticado cáncer, normalmente se somete en primer lugar a resección de tejido en un intento de curación. Se obtiene muestras de tumor de la porción del tejido extraída del paciente. El ARN se aísla entonces de las muestras de tejido usando cualquier método apropiado para la extracción de ARN pequeños que sea bien conocido en la técnica, tal como mediante el uso de TRIZOLTM. El ARN purificado se somete entonces a RT-PCR usando cebadores específicos para miR21 u otros miARN expresados diferencialmente divulgados, opcionalmente junto con análisis genético. Estos ensayos se ejecutan para determinar el nivel de expresión del ARN pertinente en el tumor. Si se determina el patrón de expresión de miR expresado diferencialmente, especialmente si se establece el estado mutante, el paciente es un candidato para el tratamiento con las composiciones en el presente documento.

Por consiguiente, el paciente se trata con una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. La dosis y el régimen de dosificación de las composiciones variarán dependiendo de la variedad de factores, tales como el estado de salud del paciente y el estadio del cáncer. Normalmente, el tratamiento se administra en muchas dosis a lo largo del tiempo.

Ejemplo 8.

Métodos de diagnóstico de los pacientes con cáncer

En un aspecto particular, se proporciona en el presente documento un método para diagnosticar si un sujeto tiene, o corre el riesgo de desarrollar, cáncer. El método incluye generalmente medir el patrón de expresión diferencial de miR de la expresión de miR-21 y/o la proteína MMR en comparación con el control. Si se establece un patrón de expresión de miR/proteína MMR diferencial, los resultados son indicativos del sujeto o bien que tiene, o bien que corre el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal. El nivel del al menos un producto génico se mide usando análisis de transferencia de tipo Northern. También, el nivel del al menos un producto génico en la muestra de ensayo es inferior del nivel del producto génico de miR correspondiente y/o la expresión de proteína de MMR en la muestra control, y/o el nivel del al menos un producto génico de miR y/o la expresión de proteína de MMR en la muestra de prueba es mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente y/o la expresión de proteína de MMR en la muestra control.

Ejemplo 9.

Medición de productos génicos de miR

El nivel del al menos un producto génico de miR puede medirse mediante transcripción inversa de ARN a partir de una muestra de prueba obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; hibridación de los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de prueba; y, comparar el perfil de hibridación de la muestra de prueba con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control. Una alteración en la señal de al menos un miARN es indicativa de que el sujeto o bien tiene, o bien corre el riesgo de desarrollar, cáncer colorrectal.

Ejemplo 10.

Aplicación de diagnóstico y terapéutica

En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento métodos de tratamiento de un cáncer en un sujeto, cuando la señal de al menos un miARN, con respecto a la señal generada a partir de la muestra control, está desregulada (por ejemplo, regulada por disminución y/o regulada por incremento).

También se proporcionan en el presente documento métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o corre el riesgo

de desarrollar un cáncer asociado con uno o más marcadores de pronóstico en un sujeto, mediante transcripción inversa de ARN a partir de una muestra de prueba obtenida a partir del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana; hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo; y, comparar el perfil de hibridación de la muestra de prueba con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control. Una alteración en la señal es indicativa de que el sujeto o bien tiene, o bien corre el riesgo de desarrollar, el cáncer.

Ejemplo 11.

Kits

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitativo, los reactivos para aislar miARN, marcar miARN, y/o evaluar una población de miARN usando una matriz, están incluidos en un kit. El kit puede incluir además reactivos para crear o sintetizar sondas de miARN. Los kits comprenderán por lo tanto, en medios de envase adecuados, una enzima para marcar el miARN mediante incorporación de nucleótido marcado o nucleótidos no marcados que se marcan posteriormente. Puede incluir también uno o más tampones, tales como tampón de reacción, tampón de marcado, tampón de lavado, o un tampón de hibridación, compuestos para preparar las sondas de miARN, y componentes para aislar miARN. Otros kits pueden incluir componentes para preparar una matriz de ácido nucleico que comprende oligonucleótidos complementarios a miARN, y por lo tanto, pueden incluir, por ejemplo, un soporte sólido.

Para cualquier kit, incluyendo una matriz, puede haber moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia que sea idéntica o complementaria a todo o parte de cualquiera de las secuencias en el presente documento.

Los componentes de los kits pueden empaquetarse o bien en medios acuosos o bien en forma liofilizada. Los medios de envase de los kits incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringuilla u otro medio de envase, en los que puede colocarse un componente, y preferiblemente, se toman alícuotas de manera adecuada. Cuando hay más de un componente en el kit (reactivo de marcado y etiqueta pueden estar empaquetados juntos), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro envase adicional en el que pueden colocarse por separado los componentes adicionales. Sin embargo, diversas combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits divulgados en el presente documento también incluirán normalmente un medio para contener los ácidos nucleicos, y cualquier otro envase de reactivo en estrecho confinamiento para la venta comercial. Los envases de este tipo pueden incluir envases de plástico moldeados por inyección o por soplado en los que están retenidos los viales deseados.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo una solución acuosa estéril una solución preferida. Otras soluciones que pueden incluirse en un kit son aquellas soluciones implicadas en el aislamiento y/o en enriquecimiento de miARN a partir de una muestra mixta.

Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente pueda proporcionarse también en otro medio de envase. Los kits pueden incluir también componentes que faciliten el aislamiento del miARN marcado. Puede incluir también componentes que conservan o mantienen el miARN o que protegen contra su degradación. Los componentes pueden ser libres de RNasas o proteger contra RNasas.

También, los kits pueden comprender generalmente, en medios adecuados, distintos envases para cada reactivo o solución individual. El kit puede incluir también instrucciones para el empleo de los componentes del kit así como el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que pueden implementarse. Se contempla que tales reactivos son parte de kits divulgados en el presente documento. También, los kits no se limitan a los artículos particulares identificados anteriormente y pueden incluir cualquier reactivo usado para la manipulación o caracterización de miARN.

Se contempla también que cualquier característica analizada en el contexto de una matriz de miARN puede emplearse más generalmente en la selección o el perfilado de métodos o kits divulgados en el presente documento. En otras palabras, cualquier característica que describe lo que puede incluirse en una matriz particular puede ponerse en práctica en el contexto del perfilado de miARN más generalmente y no es necesario que implique una matriz en sí.

Se contempla también que cualquier kit, matriz u otra técnica de detección o herramienta, o cualquier método puede implicar el perfilado para cualquiera de estos miARN. También, se contempla que cualquier característica analizada en el contexto de una matriz de miARN puede implementarse con o sin el formado de matriz en los métodos divulgados en el presente documento; en otras palabras, cualquier miARN en una matriz de miARN puede seleccionarse o evaluarse en cualquier método divulgado en el presente documento de acuerdo con cualquier

técnica conocida por los expertos en la técnica. El formado de matriz no se requiere para los métodos de selección y diagnóstico que van a implementarse.

5 Los kits para su uso en matrices para el uso de matrices de miARN para aplicaciones terapéuticas, de pronóstico o de diagnóstico y tales usos se contemplan por los inventores en el presente documento. Los kits pueden incluir una matriz de miARN, así como información referente a un perfil de miARN patrón o normalizado para los miARN en la matriz. También, pueden incluirse ARN o ADN control en el kit. El ARN control puede ser miARN que puede usarse como control positivo para marcar y/o análisis de matriz.

10 Los métodos y kits de las presentes enseñanzas se han descrito ampliamente y de forma genérica en el presente documento. Cada una de las especies más estrechas y agrupaciones subgenéricas que entran dentro de la descripción genérica también forman parte de las actuales enseñanzas. Esto incluye la descripción genérica de las actuales enseñanzas con una condición o limitación negativa de eliminar cualquier materia objeto del género, independientemente de si el material extirpado se menciona o no específicamente en el presente documento.

15

Ejemplo 12.

Preparación de matrices y selección

20 También se proporcionan en el presente documento la preparación y el uso de matrices de miARN, que son macromatrices o micromatrices ordenadas de moléculas de ácido nucleico (sondas) que son totalmente o casi complementarias o idénticas a una pluralidad de moléculas de miARN o moléculas de miARN precursor y que están situadas en un material de soporte en una organización espacialmente separada. Las micromatrices son normalmente láminas de nitrocelulosa o nailon sobre las que se han introducido por puntos sondas. Las micromatrices sitúan las sondas de ácido nucleico más densamente, de manera que hasta 10.000 moléculas de ácido nucleico pueden encajar en una región de normalmente 1 a 4 centímetros cuadrados.

25

Las micromatrices pueden fabricarse añadiendo por puntos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, genes, oligonucleótidos, etc., sobre sustratos o fabricando secuencias de oligonucleótidos *in situ* sobre un sustrato. Las moléculas de ácido nucleico aplicadas por puntos o fabricadas pueden aplicarse en una patrón de matriz de alta densidad de hasta aproximadamente 30 moléculas de ácido nucleico no idénticas por centímetro cuadrado o superior, por ejemplo hasta aproximadamente 100 o incluso 1000 por centímetro cuadrado. Las micromatrices usan normalmente vidrio recubierto como el soporte sólido, al contrario del material a base de nitrocelulosa de las matrices de filtro. Al tener una matriz ordenada de muestras de ácido nucleico que complementa el miARN, puede seguirse la posición de cada muestra y relacionarse con la muestra original.

30

35

Varios dispositivos de matriz diferentes en los que una pluralidad de distintas sondas de ácido nucleico están asociadas de manera estable con la superficie de un soporte sólido se conocen por los expertos en la técnica. Los sustratos útiles para matrices incluyen nailon, vidrio y silicio. Las matrices pueden variar en varios modos, incluyendo la longitud de sonda promedio, la secuencia o los tipos de sondas, la naturaleza del enlace entre la sonda y la superficie de matriz, por ejemplo covalente o no covalente, y similares. Los métodos de marcado y selección descritos en el presente documento y las matrices no están limitados en su utilidad con respecto a ningún parámetro excepto que las sondas detectan miARN; en consecuencia, los métodos y las composiciones pueden usarse con varios tipos de matrices de miARN diferentes.

40

45

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones siguientes.

Listado de secuencias

- 50 <110> THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
<
120> MATERIALES Y MÉTODOS RELACIONADOS CON MICROARN-21, REPARACIÓN DE DESAPAREAMIENTO Y CÁNCER COLORRECTAL
- 55 <130> 53-52535

<140>
<141>
- 60 <150> 61/413.180
<151> 12-11-2010

<160> 14
- 65 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 606 146 T3

	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
10	<400> 1	20
	cagaaagccc tggaactga	
	<210> 2	
	<211> 25	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
20	<400> 2	25
	ttccatagt gtaactgtc agtgc	
	<210> 3	
	<211> 40	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
30	<400> 3	40
	cccagtaatg gaatgaaggg tctgtaatag tttatattg	
	<210> 4	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 4	19
	aaatgttgct gtg'gccta	
45	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 5	19
55	aaatgttgct gtg'gccta	
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
65	<400> 6	21
	tcaattgcaa acagtcctca g	

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 <400> 7
 10 tcaattgcaa acagtcctca g 21
 <210> 8
 <211> 40
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 20 <400> 8
 caatataaaa ctattacaga cccttcattc cattactggg 40
 <210> 9
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 30 <400> 9
 tagctttcc tccccattt 20
 <210> 10
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 40 <400> 10
 ccaccttgt cagaagtcaa ctc 23
 45 <210> 11
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 11
 gaaugaaggu aaauugaua agcuau 26
 <210> 12
 <211> 22
 55 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 60 uagcuuauca gacugauguu ga 22
 <210> 13
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 65 <400> 13

ES 2 606 146 T3

	acaacauuau gaucuaauaa acuu	24
	<210> 14	
	<211> 22	
5	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	
10	uagcuuauca gacugauguu ga	22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de materia para su uso en el tratamiento de cáncer colorrectal (CCR) en un paciente que tiene expresión disminuida de la proteína hMSH2 (complejo de proteína de reconocimiento de reparación de desapareamiento (MMR)) y que responde más al tratamiento con 5-fluorouracilo, comprendiendo la composición: una cantidad efectiva de miR-21 antisentido y una formulación farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde miR-21 tiene la **SEQ ID**. No.12.
- 10 2. Una composición de materia para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el miR-21 antisentido comprende un ácido nucleico bloqueado (LNA).
- 15 3. Una composición de materia para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el paciente tiene al menos una afección seleccionada del grupo que consiste en: cáncer colorrectal resistente a 5-fluorouracilo primario, cáncer colorrectal resistente a 5-fluorouracilo adquirido, cáncer colorrectal en estadio II y cáncer colorrectal en estadio III.



Fig. 1A

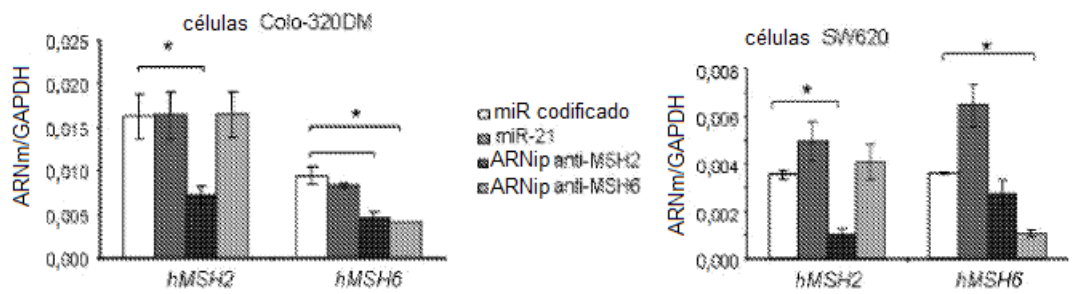


Fig. 1B

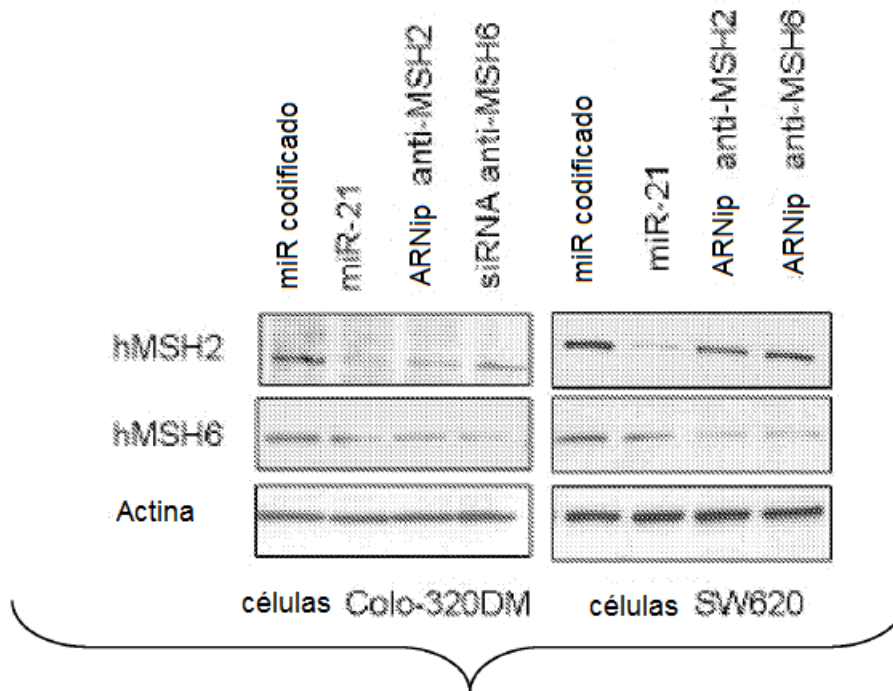


Fig. 1C

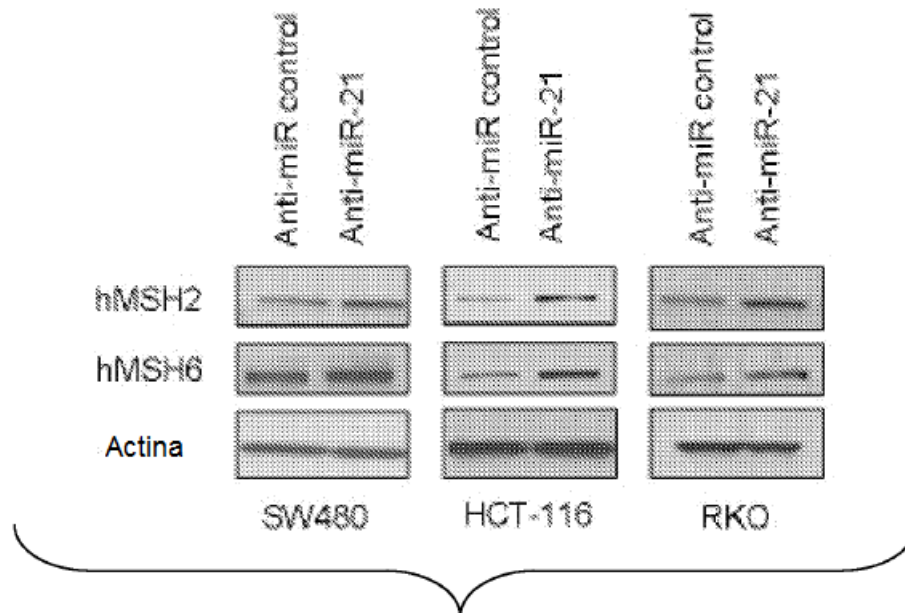


Fig. 1D

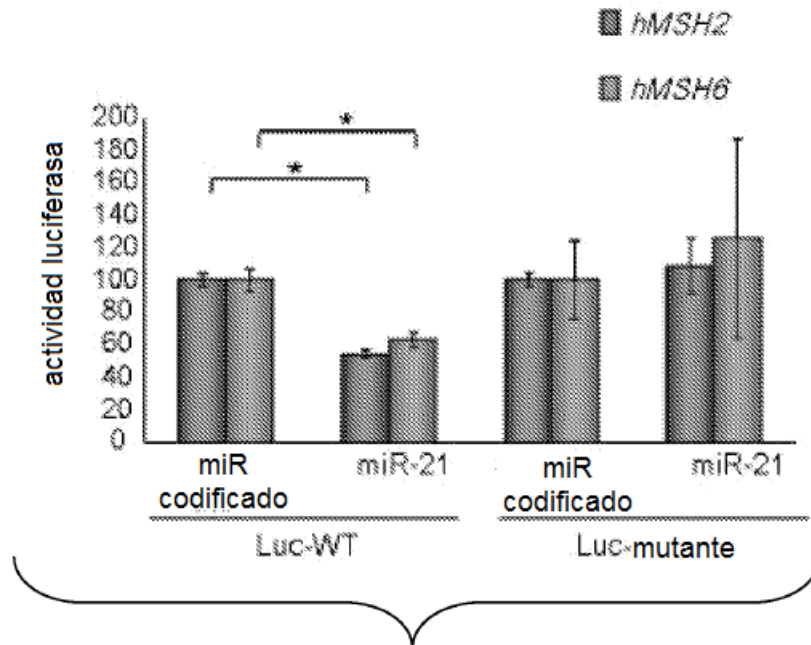


Fig. 1E

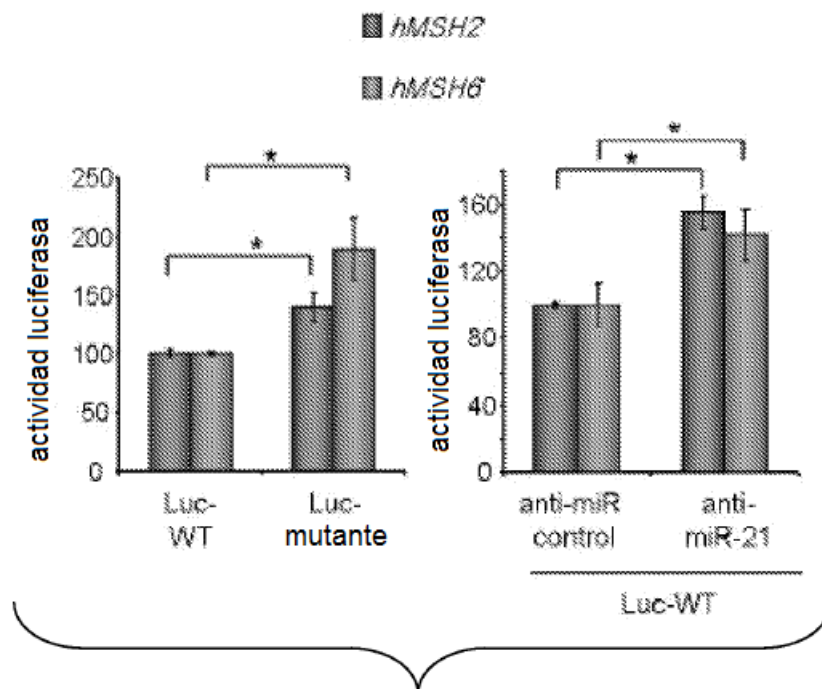


Fig. 1F

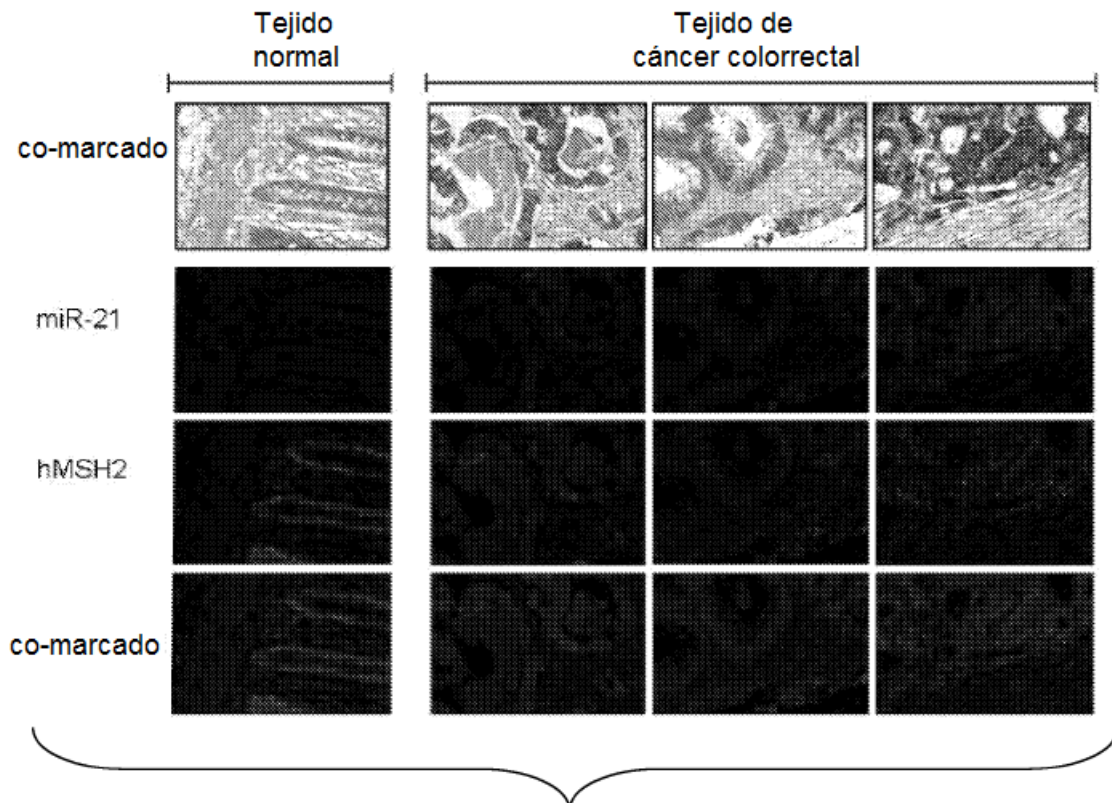


Fig. 2A

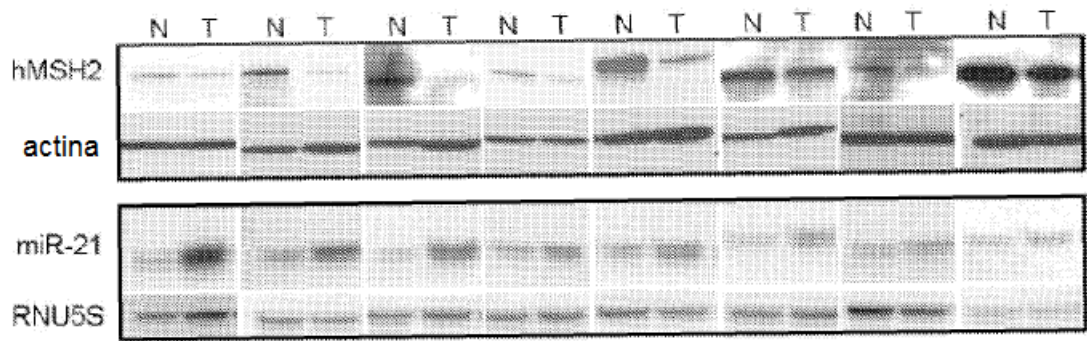


Fig. 2B

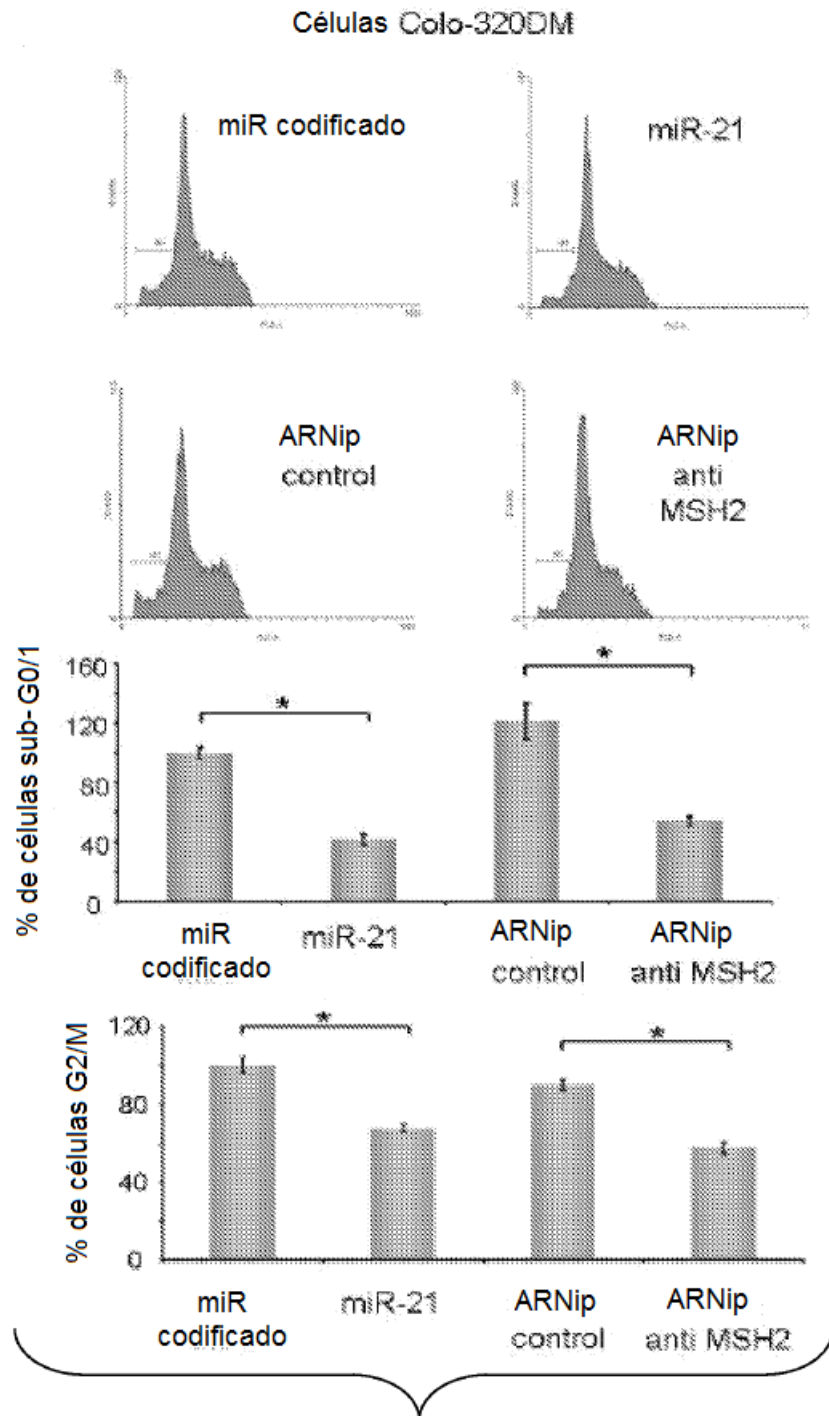


Fig. 3A

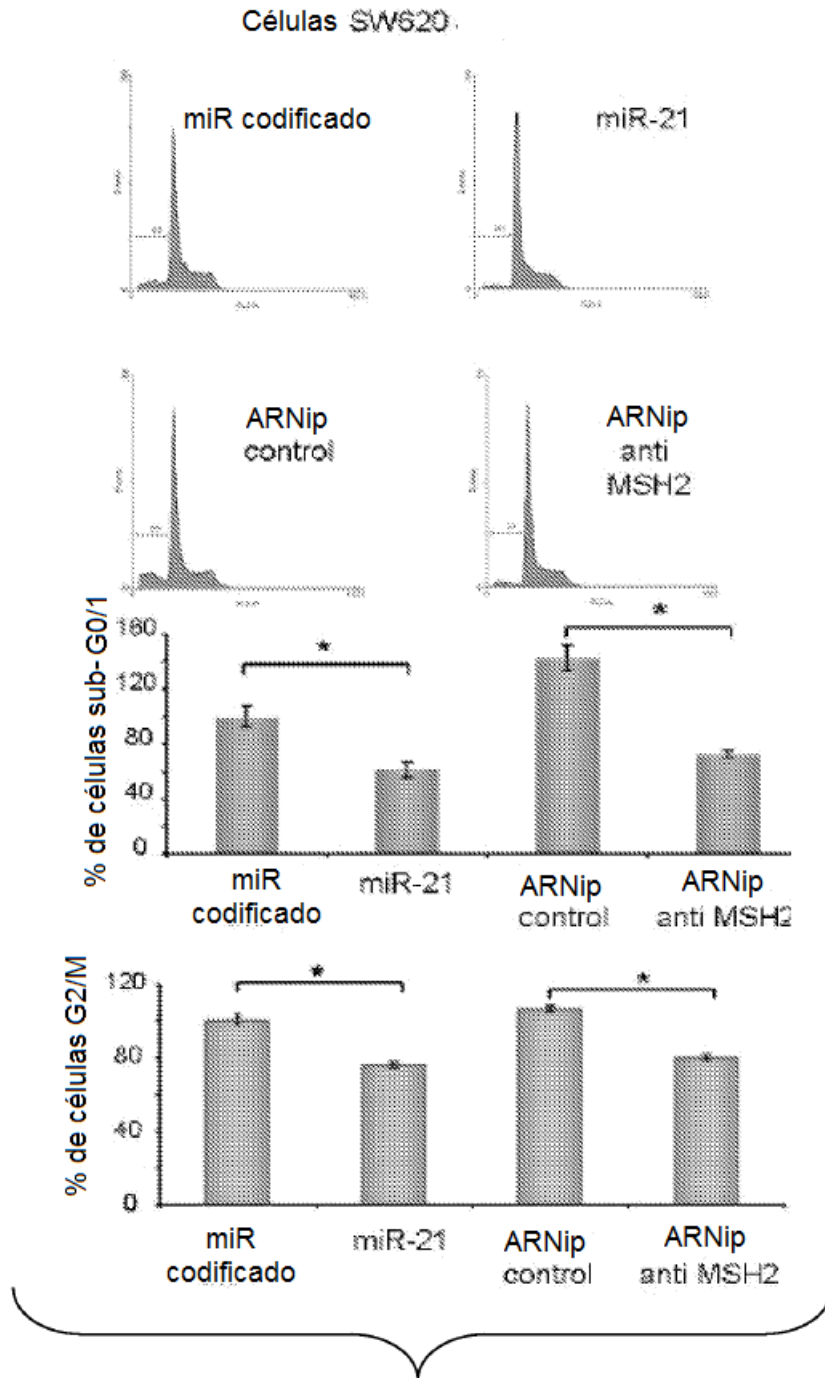


Fig. 3B

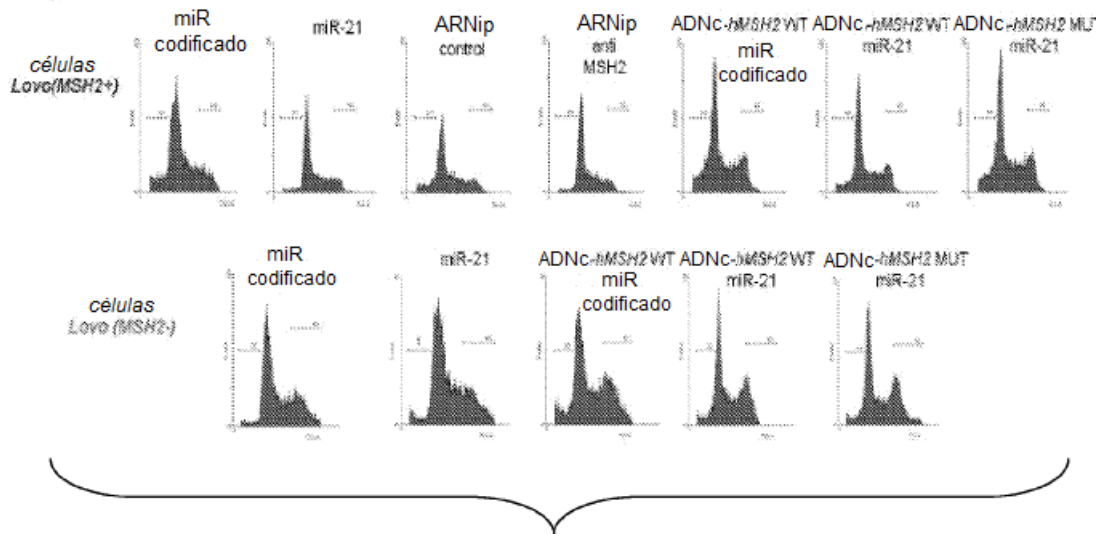


Fig. 4A

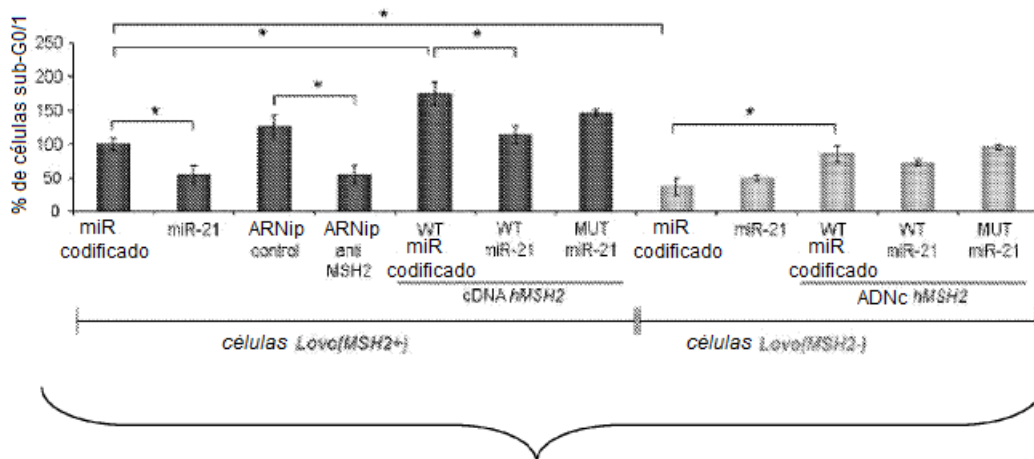


Fig. 4B

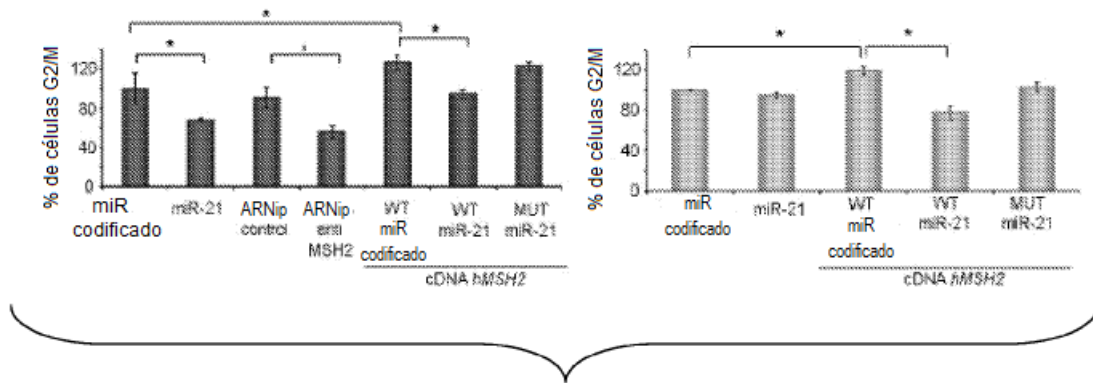


Fig. 4C

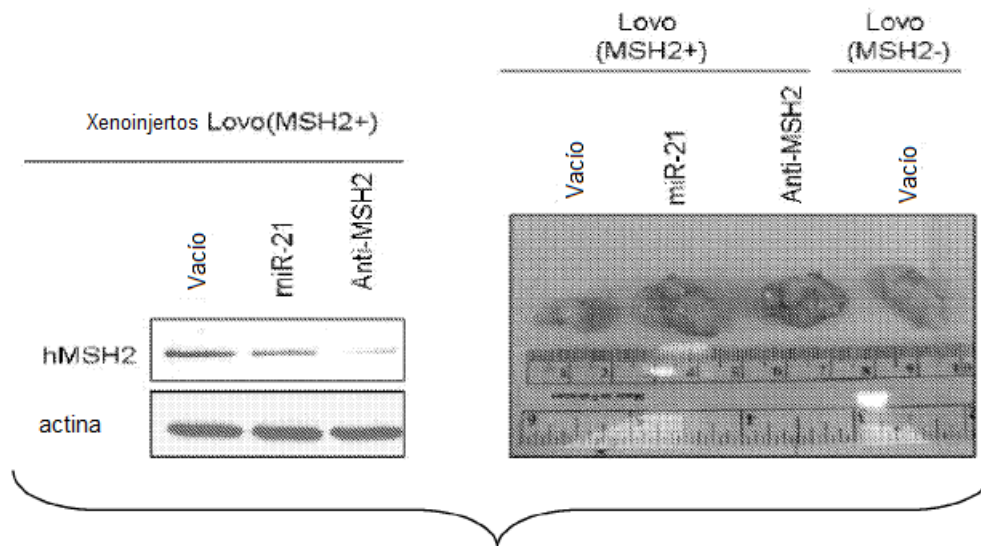


Fig. 5A

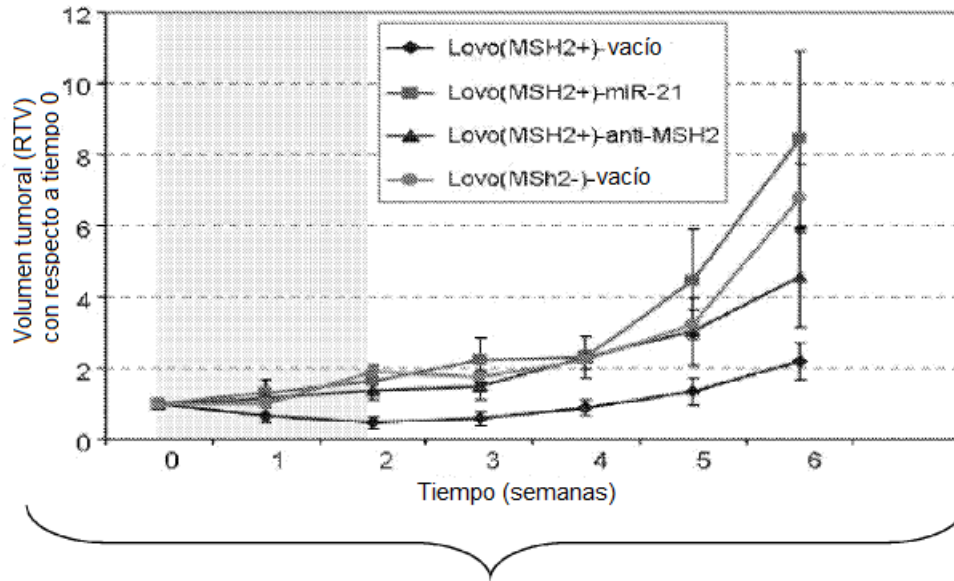


Fig. 5B

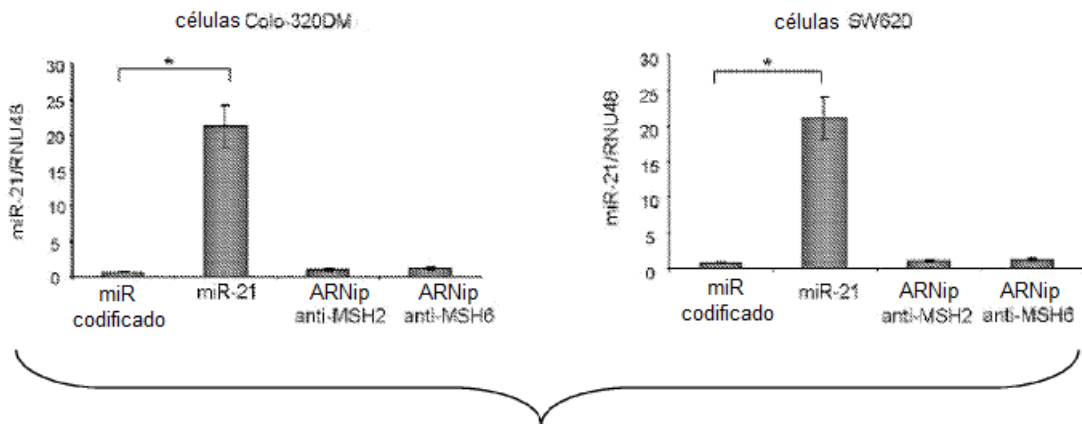


Fig. 6A

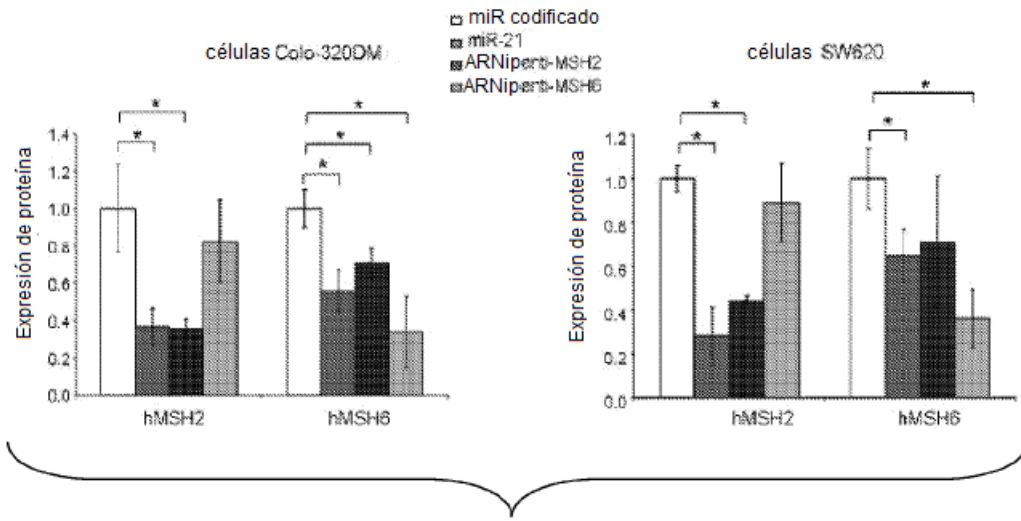


Fig. 6B

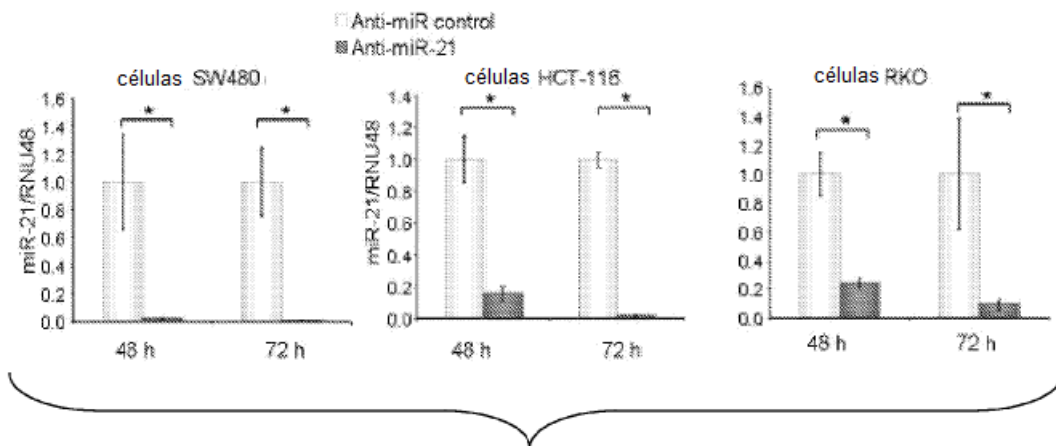


Fig. 7A

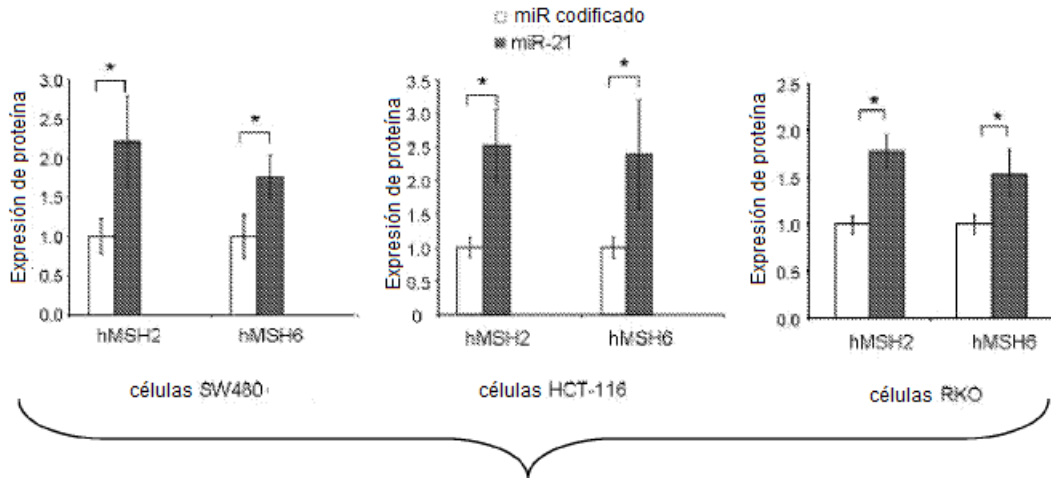


Fig. 7B

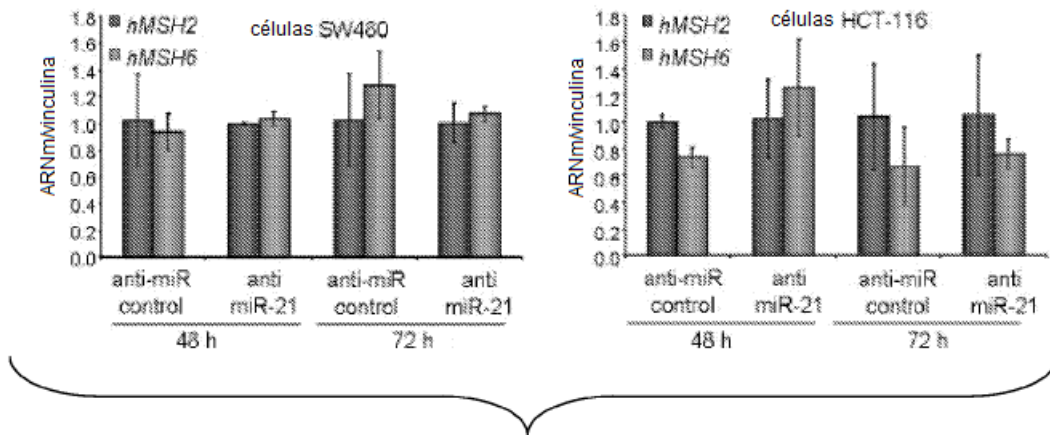


Fig. 7C

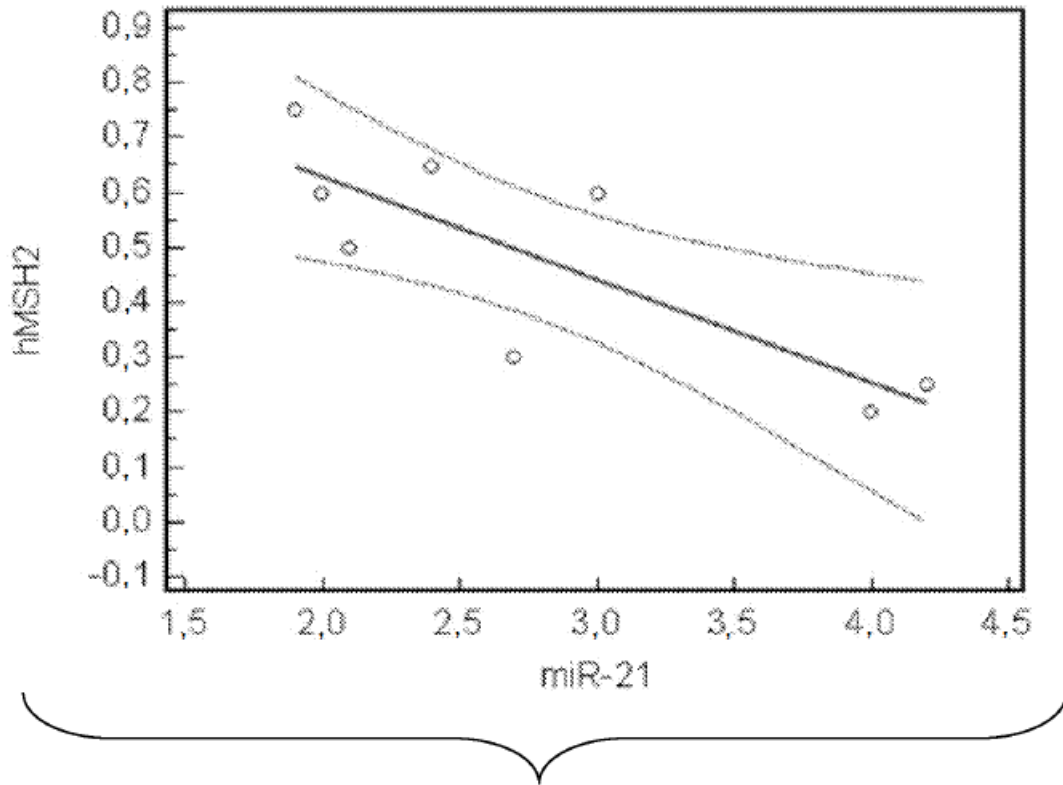


Fig. 8

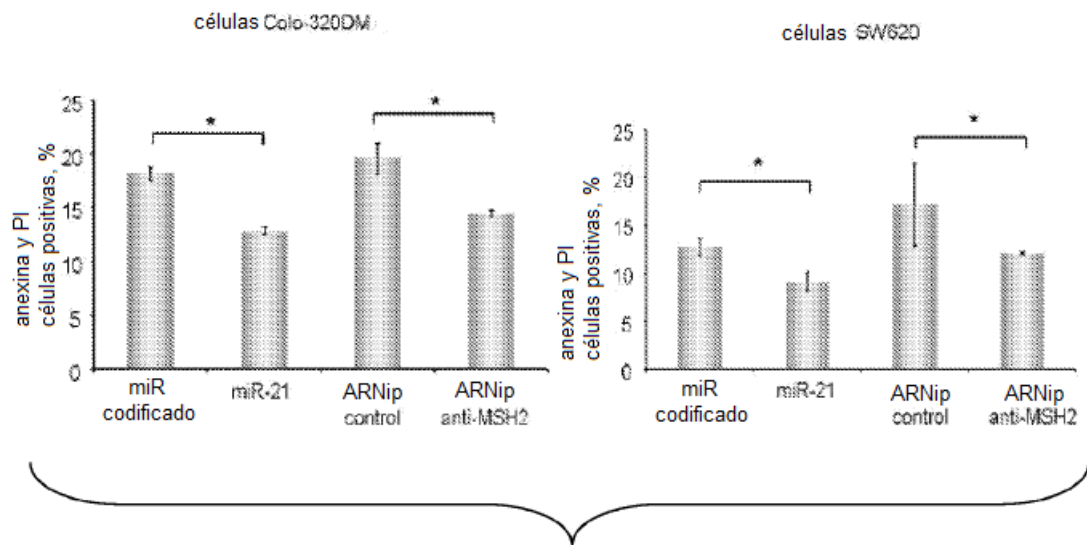


Fig. 9