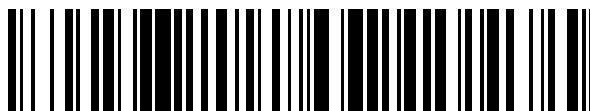


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 923**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2010 PCT/AU2010/001578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11063456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010 E 10832418 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2521555**

54 Título: **Métodos y composiciones para aumentar la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa**

30 Prioridad:

24.11.2009 AU 2009905758

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

17.04.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA
(100.0%)**

Nedlands, Western Australia 6907, AU

72 Inventor/es:

**LEEDMAN, PETER JEFFERY;
GILES, KEITH MICHAEL y
KALINOWSKI, FELICITY CARIS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 608 923 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para aumentar la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa

5 Referencia cruzada con una solicitud relacionada

Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud de patente provisional australiana N.º 2009905758, presentada el 24 noviembre de 2009.

10 Campo técnico

La presente invención se describe en las reivindicaciones 1-13 y se refiere en general a métodos para aumentar la sensibilidad de células enfermas, en particular de células cancerosas, a los inhibidores de la tirosina quinasa. En particular, la presente invención se refiere a métodos para aumentar la sensibilidad de los cánceres resistentes a inhibidor de la tirosina quinasa, a los inhibidores de la tirosina quinasa que se dirigen de forma específica o selectiva al receptor del factor de crecimiento epidérmico y su ruta de señalización.

Antecedentes

20 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor tirosina quinasa activado por ligando y un miembro de la familia de receptores ErbB. Los ligandos del EGFR incluyen a miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) tales como el EGF, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), el factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HB-EGF), anfirregulina (AR), epirregulina (EPR), betacelulina (BTC), epigén y neurregulinas (NRG)-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4. La alteración de la regulación del ligando del EGFR es evidente en varias enfermedades. Por ejemplo, en el carcinoma amicrocítico de pulmón, el TGF α plasmático aumentado está asociado con la resistencia a erlotinib y la anfirregulina aumentada es un indicador de mal pronóstico.

30 El EGFR es una diana para las terapias anticancerosas y su expresión esta aumentada en un gran número de cánceres. Por ejemplo, más del 80 % de todos los cánceres de cabeza y cuello (los CCC) tienen expresión aumentada del EGFR. La señalización a partir del EGFR da como resultado la activación aguas abajo de las rutas de la fosfoinositida 3 quinasa (PI3K)/Akt y de Ras/Raf/MAPK, que promueven la proliferación, la invasión, la metástasis, la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis tumorales, todo lo cual contribuye a la progresión del cáncer y a un mal pronóstico del paciente. Se han desarrollado como agentes terapéuticos anticancerosos varios inhibidores del EGFR que actúan como inhibidores de la tirosina quinasa. Sin embargo, en experimentos clínicos con una variedad de cánceres que incluyen al CCC se han conseguido resultados limitados con los inhibidores de la tirosina quinasa que tienen como objetivo al EGFR, incluyendo gefitinib y erlotinib, y el anticuerpo monoclonal cetuximab. Uno de los principales desafíos frente al uso clínico de los inhibidores de la tirosina quinasa anti EGFR es la resistencia intrínseca y adquirida de los cánceres a estos agentes terapéuticos. Existe un aumento del interés en el, y una creciente necesidad del, desarrollo de estrategias eficaces para superar la resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa y en general de aumentar la eficacia de los inhibidores de la tirosina quinasa.

45 Los microARN (los miARN) son una clase abundante de ARN altamente conservados, pequeños (normalmente de 21-25 nucleótidos), endógenos, que no codifican proteínas, que regulan de forma negativa la expresión génica. Los miARN se unen a regiones 3' no traducidas específicas (las 3' UTR) dentro de los ARN mensajeros (ARNm) para inducir una escisión o la represión traduccional del ARNm. Un miARN individual normalmente se une de forma incompleta a su ARN mensajero (ARNm) diana afín y un único miARN puede regular la expresión de múltiples genes.

50 Los miARN se generan a partir de ARN precursores (los pri-miARN) que habitualmente contienen varios cientos de nucleótidos transcritos a partir de regiones de ADN no codificante. Los pri-miARN se procesan en el núcleo mediante la endonucleasa RNasa III para formar precursores en estructura de tallo-lazo (los pre-miARN) de aproximadamente 70 nucleótidos. Los pre-miARN se transportan de forma activa al citoplasma, en donde se procesan adicionalmente para dar dúplex de ARN cortos, normalmente de 21-23 pb. La cadena funcional de miARN se disocia de su cadena no funcional complementaria y se emplaza en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, acrónimo del inglés *RNA-induced silencing complex*). (Como alternativa, el RISC puede cargar de forma directa estructuras en horquilla pre-miARN). Los miARN se unen a los 3'UTR de los ARNm diana y en esta unión es importante la denominada región 'semilla' de aproximadamente 6-7 nucleótidos, cerca del extremo 5' del miARN (normalmente, las posiciones de nucleótido 2 a 8). El papel del extremo 3' es menos claro. La regulación de la expresión génica inducida por miARN normalmente se consigue mediante represión traduccional, ya sea degradando proteínas a medida que emergen de los ribosomas o 'congelando' ribosomas, y/o promoviendo el movimiento de los ARNm diana a los sitios de destrucción de ARN.

65 Los miARN son cruciales para muchas funciones celulares normales y están implicados en procesos tales como la división de las células madre, el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, la inflamación y la inmunidad. Además, se está implicando cada vez más en una diversidad de patologías, incluyendo el cáncer, a miARN

específicos, y a los patrones de expresión y la regulación alterada de la expresión de miARN individuales. Algunos miARN están alterados en el cáncer y pueden actuar como supresores tumorales u oncogenes. Por ejemplo, let-7d (un miembro de la familia let-7 de los miARN) regula la expresión del oncogén RAS en tejido de cabeza y cuello normal, aunque la expresión de let-7d esta reducida en muchos cánceres de cabeza y cuello, lo que provoca la regulación positiva de la expresión de RAS, el crecimiento tumoral aumentado y la supervivencia reducida del paciente. Por el contrario, la expresión de miR-184 está regulada de forma positiva en el carcinoma escamoso de lengua, lo que conduce a la expresión aumentada del oncogén c-Myc, la proliferación celular aumentada y el crecimiento tumoral.

10 Sumario

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para sensibilizar una célula cancerosa que expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, como se define en las reivindicaciones 9-13.

15 Normalmente, la sensibilización hace a la célula susceptible a una dosis citostática o citotóxica del inhibidor de la tirosina quinasa que es más baja que la dosis citostática o citotóxica necesaria en ausencia del miARN.

20 El inhibidor de la tirosina quinasa puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o un anticuerpo. En realizaciones particulares el inhibidor de la tirosina quinasa puede seleccionarse de erlotinib, gefitinib y AG1478.

25 El miARN miR-7 puede ser hsa-miR-7 y puede comprender la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. El precursor del miARN miR-7 puede seleccionarse de hsa-miR-7-1, hsa-miR-7-2 y hsa-miR-7-3, y puede comprender una secuencia como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 4.

30 En el presente documento se describe un método para sensibilizar una célula enferma que expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta señalización, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un agente que tenga la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA, mediante lo cual la expresión o la actividad del miARN estimulada o potenciada, sensibiliza la célula enferma al inhibidor de la tirosina quinasa.

35 En un segundo aspecto la presente invención proporciona medios para el tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que las células cancerosas expresan o tienen expresión aumentada del EGFR, comprendiendo el método administrar al sujeto una combinación de un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización y un miARN miR-7, como se define en las reivindicaciones 1-8.

40 El cáncer puede presentar resistencia al inhibidor de la tirosina quinasa en ausencia de tratamiento. La resistencia puede ser adquirida o innata.

45 El cáncer que expresa EGFR puede seleccionarse de, por ejemplo, un cáncer de cabeza o cuello, un glioblastoma, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer nasofaríngeo, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón incluyendo carcinoma amocítico de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de hígado, neuroblastoma o melanoma.

El inhibidor de la tirosina quinasa puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o un anticuerpo. En realizaciones particulares el inhibidor de la tirosina quinasa se selecciona de erlotinib, gefitinib y AG1478.

50 El miARN miR-7 puede ser hsa-miR-7 y puede comprender la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. El precursor del miARN miR-7 puede seleccionarse de hsa-miR-7-1, hsa-miR-7-2 y hsa-miR-7-3, y puede comprender una secuencia como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 4.

55 El inhibidor de la tirosina quinasa y el miARN pueden administrarse en una única composición, formulados junto con transportadores, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables o pueden administrarse en composiciones separadas. Cuando los agentes se administran de forma separada, la administración puede ser simultánea o secuencial.

60 En realizaciones particulares la administración del miARN hace al cáncer susceptible a una dosis citostática o citotóxica del inhibidor de la tirosina quinasa, que es más baja que la dosis citostática o citotóxica que se necesita en ausencia del miARN. Por consiguiente, cuando la administración es secuencial, normalmente el miARN se administra antes del inhibidor de la tirosina quinasa.

65 En el presente documento se describe el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde las células cancerosas expresan o tienen expresión aumentada del EGFR, que comprende administrar al sujeto una combinación de un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización, y un agente que tiene

la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA.

5 En el presente documento se describe el uso de un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta e señalización, y un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que las células cancerosas expresan o tienen expresión aumentada del EGFR.

10 En el presente documento se describe el uso de un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización, y un agente que tiene la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que las células cancerosas expresan o tienen expresión aumentada del EGFR.

15 En el presente documento se describe la prevención o reducción del crecimiento tumoral, la metástasis del cáncer o la reaparición en un sujeto en el que el tumor o las células cancerosas expresan o tienen expresión aumentada del EGFR, que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces de un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización, y un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA.

20 En el presente documento se describe la prevención o reducción del crecimiento tumoral, la metástasis del cáncer o la reaparición en un sujeto, en el que el tumor o las células cancerosas expresan o tienen expresión aumentada del EGFR, que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces de un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización, y un agente que tiene la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA.

25 En el presente documento se describe un método para determinar el cambio de la sensibilidad de un cáncer que expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización, comprendiendo el método:

- 30
- (a) administrar a un sujeto un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA;
 - 35 (b) determinar el nivel de expresión de un ligando del EGFR en una muestra biológica del sujeto;
 - (c) repetir las etapas (a) y (b) al menos una vez a lo largo de un periodo de tiempo; y
 - (d) comparar el nivel de expresión del ligando del EGFR en las muestras,

40 en el que un cambio en el nivel de expresión del ligando del EGFR es indicativo de la sensibilidad del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa.

45 El ligando del EGFR puede ser TGF α , HB-EGF, anfirregulina, epirregulina, betacelulina, epigén, NRG-1, NRG-2, NRG- 3 o NRG-4. En realizaciones particulares el ligando del EGFR es TGF α . La muestra puede comprender plasma sanguíneo o suero sanguíneo. Normalmente, un elevado nivel de expresión de TGF α en las células cancerosas con respecto a las células normales es indicativo de resistencia del cáncer a un inhibidor de la tirosina quinasa. Por lo tanto, además, normalmente una reducción en el nivel de expresión de TGF α en las células cancerosas es indicativo de un aumento de la sensibilidad del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa. El inhibidor de la tirosina quinasa puede ser erlotinib.

50 En el presente documento se describe el tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que las células cancerosas expresan o tiene expresión aumentada del EGFR, que comprende

- (a) administrar al sujeto un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA;
- 55 (b) obtener una muestra biológica a partir del sujeto;
- (c) determinar el nivel de expresión y/o actividad del ligando del EGFR en la muestra;
- (d) repetir las etapas (b) y (c) al menos una vez a lo largo de un periodo de tiempo del tratamiento;
- (e) determinar si la expresión y/o actividad del ligando del EGFR cambia a lo largo del periodo de tiempo; y
- (f) administrar un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización, cuando es evidente un cambio del nivel de expresión y/o actividad del ligando del EGFR.

60 En el presente documento se describe un método para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento en un sujeto que padece cáncer, en el que las células cancerosas expresan o tienen expresión aumentada del EGFR, comprendiendo el método:

- 65
- (a) tratar al sujeto con una combinación de un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización, y un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende

una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA, durante un periodo suficiente para evaluar la eficacia del régimen;

(b) obtener una muestra biológica del sujeto;

(c) determinar el nivel de expresión de un ligando del EGFR en la muestra;

5 (d) repetir las etapas (b) y (c) al menos una vez a lo largo de un periodo de tiempo del tratamiento; y

(e) determinar si la expresión del ligando del EGFR cambia a lo largo del periodo de tiempo,

en el que un cambio en el nivel de expresión del ligando del EGFR es indicativo de la eficacia del régimen de tratamiento.

10 El nivel de expresión del TGF α en la muestra puede ser predictivo del nivel de sensibilidad o resistencia del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa, y por consiguiente puede ajustarse el régimen de tratamiento.

15 En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización, y un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA, o un agente que tiene la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de tal miARN.

20 Breve descripción de las figuras

Las realizaciones de la invención se describen y ejemplifican en el presente documento solo a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a las siguientes figuras.

25 La Figura 1 muestra la caracterización de la expresión de la ruta del EGFR y la sensibilidad a erlotinib de las líneas celulares de CCC. (A) muestra una detección por inmunotransferencia de la expresión relativa del EGFR, P-EGFR, Akt, P-Akt y β actina (control), utilizando extractos de proteína recogidos de las líneas celulares de CCC FaDu, SCC-9 y HN5, 24 h después de la restricción de suero en los medios que contienen SFB al 0,5 %. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. (B) muestra la sensibilidad de tres líneas celulares de CCC a erlotinib. Los datos se expresan como máximo crecimiento celular 3 d después de la adición de erlotinib a concentraciones entre 0 μ M (control negativo de DMSO) y 100 μ M. Los datos están normalizados con respecto a la concentración más baja de fármaco. Las barras representan la diferencia de la media de los recuentos celulares (\pm DT) en comparación con solo el vehículo (DMSO). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

35 La Figura 2 muestra que miR-7 regula la expresión y la señalización del EGFR en líneas celulares de CCC. (A) muestra la detección por inmunotransferencia de la expresión del EGFR, P-EGFR, Akt, P-Akt y β actina (control) utilizando extractos de proteína recogidos de las líneas celulares de CCC FaDu y HN5, 3 d después de la transfección con vehículo (Lipofectamina 2000, LF) solo, precursor de miR-7 30 nM o de miR-CN (control negativo) 30 nM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. (B) muestra el análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión del ARNm de EGFR en células HN5, 24 h después de la transfección con el precursor de miR-7 o de miR-CN 30 nM. La expresión del ARNm de EGFR se normalizó con respecto a la expresión del ARNm de GAPDH y se muestra como una proporción de células transfectadas con miR-CN (\pm DT) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Las barras representan la expresión de ARNm media (\pm DT) en comparación con miR-CN. Los datos son representativos de un único experimento. *** indica una diferencia significativa a partir de las células tratadas con miR-CN ($p < 0,001$). (C) muestra un ensayo indicador de luciferasa para verificar la actividad de miR-7 sobre un sitio diana de miR-7 dentro del 3' UTR del EGFR de tipo silvestre de longitud completa después de 24 h de transfección. Las células FaDu se transfectaron con plásmido de 3' UTR del EGFR de luciferasa de luciérnaga de tipo silvestre de longitud completa y con precursor de miR-7 o miR-CN 1 nM. Los valores de expresión de luciferasa relativos (de luciérnaga normalizados con respecto a *Renilla*) se expresan como una proporción del vehículo solo (Lipofectamina 2000, LF). Las barras representan la desviación típica (DT). Los datos son representativos de un único experimento. *** indica una diferencia significativa a partir del vector indicador tratado con vehículo (Lipofectamina 2000, LF) ($p < 0,001$).

55 La Figura 3 muestra que las células de CCC HN5, sensibles a erlotinib, son sensibles al bloqueo de la ruta del EGFR mediante miR-7. Análisis por título celular de la viabilidad celular 5 d después de la transfección con precursor de miR-7 o miR-CN 5 nM. Las barras representan la diferencia media de los recuentos de células (\pm DT) en comparación con el vehículo solo (Lipofectamina 2000, LF). El panel de la parte inferior es una fotografía de los pocillos utilizados para generar los datos del gráfico. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. ** indica una diferencia significativa a partir de las células tratadas con control negativo (miR-CN) ($p < 0,01$).

65 La Figura 4 muestra que las células de CCC FaDu, resistentes a erlotinib, pueden sensibilizarse a erlotinib mediante miR-7. El Panel A muestra un análisis por título celular de la viabilidad celular 7 d después de la transfección con precursor de miR-7 o miR-CN 5 nM. 3 d después de la transfección se añadió durante 4 d erlotinib (7,5 μ M). Las barras representan la diferencia media de los recuentos celulares (\pm DT) en comparación con el vehículo solo (DMSO). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.** indica una

diferencia significativa a partir de las células tratadas con erlotinib de control negativo (miR-CN) ($p < 0,01$). † indica sinergia cuando se utilizan en combinación miR-7 y erlotinib. El Panel B presenta la detección por inmunotransferencia de la expresión de EGFR, P-EGFR, Akt, P-Akt y β actina (control) utilizando extractos de proteína recogidos de células de CCC FaDu, 4 d después de la transfección con vehículo solo (Lipofectamina 2000), precursor de miR-7 o de miR-CN. 3 d después de la transfección se añadió durante 24 h erlotinib (7,5 μ M). Los datos son representativos de dos experimentos independientes. † indica tratamiento combinado con miR-7 y erlotinib.

La Figura 5 muestra que el restablecimiento de la expresión de miR-7 para células de glioblastoma de las líneas celulares U251 (A), U87 (B) y U373 (C) sensibiliza las células al inhibidor de la tirosina quinasa AG1478. Las células se transfectaron con miR-7 o miR-CN 10 nM. Después de 2 días, las células se trataron con una dosis ineficaz conocida de AG1478 (7,5 μ M para las células U251 y U87, y 12,5 μ M para las células U373) y después de 3 días adicionales se determinó el número de células viables. En (B), las barras representan de derecha a izquierda LF2000 + DMSO, LF2000 + AG1478, pre-miR-7 (10 nM) + DMSO, pre-miR-7 (10 nM) + AG1478, pre-miR-CN (10 nM) + DMSO, pre-miR-CN (10 nM) + AG1478. En (C), las barras representan de derecha a izquierda LF2000, LF2000 + AG1478 (12,5 μ M), pre-miR-7 (10 nM), pre-miR-7 (10 nM + AG1478 (12,5 μ M), pre-miR-CN (10 nM), pre-miR-CN (10 nM) + AG1478 (12,5 μ M).

Se proporciona un listado de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los identificadores de secuencia a los que se hace referencia en la memoria descriptiva. Las secuencias de nucleótidos de miR-7 humano maduro, de los precursores de miR-7 humano y de la región semilla se exponen en las SEQ ID NO: 1 a 5. Las SEQ ID NO: 6 a 9 proporcionan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio, como se ejemplifica en el presente documento.

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia plural a menos que el contexto indique otra cosa de forma clara. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a “una molécula de ácido nucleico” incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, y una referencia a “una célula” es una referencia a una o más células, y así sucesivamente.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto precise otra cosa, la palabra “comprender” y las variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa, o grupo de números enteros o etapas indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Como se utiliza en el presente documento, el término “oligonucleótido” se refiere a una secuencia monocatenaria de bases de ribonucleótido o deoxirribonucleótido, de análogos conocidos de nucleótidos naturales, o mezclas de los mismos. Un “oligonucleótido” comprende una molécula a base de ácido nucleico que incluye ADN, ARN, APN, ALN o cualquier combinación de los mismos. Un oligonucleótido que comprende de forma predominante bases de ribonucleótido, naturales o no naturales, puede denominarse como un oligonucleótido de ARN. Los oligonucleótidos normalmente son secuencias cortas (por ejemplo de menos de 50 nucleótidos de longitud) que pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, que incluye, por ejemplo, la síntesis química directa, o la clonación y la restricción de secuencias apropiadas. “Oligonucleótidos antisentido” son oligonucleótidos complementarios a una secuencia de ADN o ARN específica. Normalmente, en el contexto de la presente invención, un oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de ARN complementario a un miARN específico. El oligonucleótido antisentido se une a y silencia o reprime, de forma parcial o completa, la actividad de su miARN complementario. No todas las bases en un oligonucleótido antisentido necesitan ser complementarias con la secuencia ‘diana’ o de miARN; el oligonucleótido necesita solo contener suficientes bases complementarias para permitir que el oligonucleótido reconozca la diana. Un oligonucleótido puede comprender también bases adicionales. La secuencia del oligonucleótido antisentido puede ser una secuencia de ribonucleótidos no modificados o puede modificarse o conjugarse de forma química mediante una diversidad de medios como se describe en el presente documento.

El término “polinucleótido”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polímero monocatenario o bicatenario de deoxirribonucleótidos, bases de ribonucleótido o análogos conocidos de nucleótidos naturales, o mezclas de los mismos. Un “polinucleótido” comprende una molécula a base de ácido nucleico que incluye ADN, ARN, APN, ALN o cualquier combinación de los mismos. El término incluye la referencia a la secuencia especificada así como a la secuencia complementaria a la misma, a menos que se indique otra cosa. Los polinucleótidos pueden modificarse de forma química mediante una diversidad de medios conocidos para los expertos en la materia. Por lo tanto, un “polinucleótido” comprende una molécula a base de ácido nucleico que incluye ADN, ARN, APN, ALN o cualquier combinación de los mismos.

La expresión “identidad de secuencia” o “porcentaje de identidad de secuencia” se puede determinar comparando dos secuencias o subsecuencias alineadas de forma óptima a lo largo de una ventana o extensión de comparación, en la que la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender de forma opcional adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (la cual no

comprende adiciones o deleciones), para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

Como se utiliza en el presente documento los términos “que trata” y “tratamiento” y los equivalentes gramaticales, se refieren a cualquiera y todos los usos que curan una afección o los síntomas, previenen el establecimiento de una afección o enfermedad, o previenen, impiden, retrasan o revierten de otra forma la evolución de una afección o enfermedad u otros síntomas no deseados de cualquier manera. Por lo tanto, el término “que trata” se debe considerar en su contexto más amplio. Por ejemplo, el tratamiento no necesariamente implica que un paciente se trate hasta la recuperación total. En condiciones que presentan o se caracterizan por múltiples síntomas, el tratamiento no necesariamente tiene que curar, prevenir, impedir, retrasar o revertir todos los dichos síntomas, pero puede prevenir, impedir, retrasar o revertir uno o más de dichos síntomas.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cantidad eficaz” incluye, dentro de su significado, una cantidad o dosis de un agente o compuesto no tóxica pero suficiente para proporcionar el efecto deseado. La cantidad exacta o dosis necesaria variará de sujeto a sujeto, dependiendo de factores tales como la especie que se trata, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se trata, el agente particular que se administra y el modo de administración, y así sucesivamente. Por lo tanto, no es posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, alguien con la experiencia habitual en la técnica puede determinar una “cantidad eficaz” apropiada utilizando solo experimentación de rutina.

Como se utiliza en el presente documento el término “selectivo”, cuando se utiliza en el contexto de la capacidad de un compuesto para inhibir la actividad tirosina quinasa del EGFR, significa que el compuesto interactúa, de forma directa o indirecta, con el EGFR, con una frecuencia significativamente más elevada que la que interactúa con otros receptores. Un inhibidor de la tirosina quinasa “específico” para el EGFR, es uno que no posee actividad discernible en ningún otro receptor. Por lo tanto, un inhibidor de la tirosina quinasa “específico” por el EGFR es, por definición, selectivo para el EGFR.

El término “sujeto”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a mamíferos e incluye seres humanos, primates, animales de producción (por ejemplo, ovejas, cerdos, ganado vacuno, caballos, burros), animales para pruebas de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas), animales de concursos y espectáculos (por ejemplo caballos, animales de producción, perros, gatos), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos) y animales silvestres en cautiverio. Preferentemente, el mamífero es un ser humano o un animal para pruebas de laboratorio. Incluso más preferentemente, el animal es un ser humano.

Descripción detallada

Ha de entenderse desde el principio que las figuras y ejemplos proporcionados en el presente documento son para ejemplificación y no para limitar la invención y sus diversas realizaciones.

Como se ejemplifica en el presente documento, los inventores han identificado el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como una diana del miARN miR-7 que está regulado de forma negativa en las líneas celulares de cáncer mediante miR-7. Adicionalmente, los inventores han identificado que el uso de miR-7 sensibiliza las células cancerosas a los inhibidores de la tirosina quinasa. Por consiguiente, en las realizaciones divulgadas en el presente documento se proporcionan métodos y composiciones para su uso en la sensibilización de una célula cancerosa que expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), a un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, utilizando miR-7, precursores de miR-7, miARN que porta la región semilla de miR-7, como se define en las reivindicaciones 1-13.

Las realizaciones de la invención emplean, a menos que se indique otra cosa, biología molecular y farmacología convencionales que son conocidas para, y dentro de las habilidades ordinarias de, los expertos en la materia. Tales técnicas se describen en, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed., (ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); "Nucleic Acid Hybridization", (Hames & Higgins eds. 1984); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait ed., 1984); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, EE. UU.; "The Merck Index", 12ª edición (1996), Therapeutic Category and Biological Activity Index y "Transcription & Translation", (Hames & Higgins eds. 1984).

La referencia en la presente memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información obtenida de ella) o a cualquier materia que es conocida, no es, y no debería tomarse como, un reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugestión de que la publicación anterior (o información obtenida de esta) o materia conocida forma parte del conocimiento general común en el campo del propósito con el que se relaciona la memoria descriptiva.

miARN

Los micro ARN (los miARN) son ARN no codificantes pequeños que funcionan como moléculas reguladoras en plantas y animales, para controlar la expresión génica mediante la unión a sitios complementarios sobre el ARNm. Sin el deseo de limitarse a teoría o hipótesis alguna, la presente invención se basa en el hallazgo de los inventores de que el miARN miR-7 se une de forma específica al 3' UTR del ARNm que codifica el EGFR. Además, los

inventores han descubierto de forma sorprendente que el aumento de la expresión de miR-7 en células cancerosas que expresan o tienen expresión aumentada del EGFR, tal como las células cancerosas de cabeza y cuello, da como resultado un nivel reducido del ARNm y de la expresión de proteína de EGFR, la señalización cadena abajo del EGFR reducida, detención del ciclo celular en la fase G1 y la muerte celular.

Los miARN se unen a los 3'UTR de los ARNm diana y, en esta unión, es importante la denominada región 'semilla' de aproximadamente 6-7 nucleótidos, cerca del extremo 5' del miARN (normalmente, en las posiciones de nucleótidos 2 a 8). Por consiguiente, las realizaciones de la presente invención contemplan de forma amplia poner en contacto células o tejidos con, o administrar a sujetos que lo necesiten, uno o más miARN, al menos uno de los cuales comprende la región semilla de miR-7. En realizaciones particulares, esta región semilla comprende la secuencia GGAAGA (SEQ ID NO: 5).

En realizaciones particulares se emplea el miR-7. La secuencia de nucleótidos del miR-7 humano se proporciona en la SEQ ID NO: 1. Se puede encontrar información adicional de la secuencia para el miARN miR-7 en <http://microma.sanger.ac.uk/sequenc-es/index.shtml>. Al igual que la mayoría de los miARN, miR-7 está altamente conservado entre distintas especies. Por lo tanto, mientras que, normalmente, el miARN puede obtenerse de la especie del sujeto a tratar, o constituye una secuencia idéntica al miARN procedente de esa especie, no es necesario que este sea el caso en vista de, por ejemplo, el elevado nivel de conservación de secuencia de las secuencias de miARN entre especies.

En el presente documento se describe la administración de variantes de miARN de miR-7. Las variantes incluyen secuencias de nucleótidos que son sustancialmente similares a las secuencias de miARN divulgadas en el presente documento. Las variantes incluyen secuencias de nucleótidos que son sustancialmente similares a las secuencias de miARN divulgadas en el presente documento. En algunas realizaciones, el miARN variante a administrar comprende una secuencia que presenta al menos el 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de miR-7 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el miARN a administrar comprende una secuencia que presenta al menos el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. El miARN a administrar puede comprender una secuencia que presenta al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. Como alternativa, o en adición, las variantes pueden comprender modificaciones, tales como restos no naturales, en una o más posiciones con respecto a la secuencia de miR-7.

Además, se contempla la administración de una molécula precursora de miR-7 como se define en las reivindicaciones. Los miARN se generan a partir de precursores de ARN (los pri-miARN), que habitualmente contienen varios cientos de nucleótidos transcritos a partir de regiones de ADN no codificante. Los pri-miARN se procesan en el núcleo mediante la endonucleasa RNasa III para formar precursores en estructura de tallo-lazo (los pre-miARN) de aproximadamente 70 nucleótidos. Los pre-miARN se transportan de forma activa al citoplasma en donde se procesan adicionalmente para dar dúplex de ARN cortos, normalmente de 21-23 pb, uno de los cuales representa la cadena de miARN funcional. Se contempla en el presente documento la administración de tales precursores pri-miARN y pre-miARN, en la que el pri-miARN o pre-miARN se escinde y se intracelulariza para generar un miARN funcional.

Además de la molécula de miR-7 de longitud completa, tal como la mostrada en la SEQ ID NO: 1, el término "miR-7" también incluye fragmentos de una molécula de miR-7, siempre y cuando los fragmentos sean fragmentos funcionales. El término "fragmento" de una molécula de miARN significa una porción de la molécula de longitud completa. El tamaño del fragmento está limitado solo en que debe ser un fragmento funcional, es decir, que tenga la capacidad de modular la expresión del EGFR, modular el crecimiento celular y/o modular la diferenciación celular. Normalmente, comprenderá al menos la secuencia de la región semilla GGAAGA (SEQ ID NO: 5).

La administración del miARN puede ser de forma directa a un sujeto que necesite tratamiento, o puede ser administración *ex vivo* a células o tejidos obtenidos del sujeto. Los miARN a administrar pueden producirse de forma sintética u obtenerse de forma natural a partir de una fuente celular.

Las realizaciones de la invención también contemplan la administración de agentes que tengan la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad del miARN descrito en el presente documento. Tales agentes pueden ser proteínaceos, no proteínaceos o a base de ácidos nucleicos, e incluyen, por ejemplo, moléculas y compuestos que tienen la capacidad de unirse a secuencias reguladoras de los genes de miARN para, de este modo, inducir o potenciar el nivel de expresión endógena del miARN. Los expertos en la materia apreciarán que el ámbito de la invención no está tan limitado y que cualquier agente que tenga la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad del miARN está contemplado y cae dentro del ámbito de la presente divulgación.

En el presente documento se describe la administración de los miARN unidos a un agente adicional que tenga la capacidad de suministrar el miARN en el sitio deseado. El agente adicional puede tener la capacidad por sí mismo de inhibir la actividad y/o expresión del EGFR. Por ejemplo, miR-7 puede estar conjugado con un anticuerpo tal como cetuximab, para dirigir el miR-7 a células que expresan el EGFR. En algunas realizaciones, la unión entre el miARN y el agente adicional es una unión escindible. La presencia de una unión escindible permite la escisión del miARN del agente adicional, por ejemplo después de la internalización en células que expresan el EGFR.

Inhibidores de la tirosina quinasa del EGFR

Las realizaciones de la invención proporcionan la administración de inhibidores de la tirosina quinasa (los TKI, sigla del inglés *tyrosine kinase inhibitor*) en circunstancias en donde es conveniente tratar un sujeto que tiene un cáncer que expresa el EGFR. Los expertos en la técnica apreciarán rápidamente que los TKI adecuados para su uso en conformidad con las realizaciones divulgadas en el presente documento pueden tomar una diversidad de formas. El TKI puede ser de naturaleza proteínica, no proteínica o a base de ácidos nucleicos. El TKI puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o un anticuerpo. El TKI puede ser un compuesto o molécula de origen natural obtenido de una fuente natural o puede ser sintético, o combinaciones de los mismos. Se entenderá que el TKI puede ser selectivo o específico para el EGFR.

Las moléculas pequeñas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas que poseen actividad TKI del EGFR incluyen las siguientes:

N-(3-clorofenil)-6,7-dimetoxi-4-quinazolinamina (AG 1478)
 N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (OSI-774, erlotinib o TARCEVA®);
 N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (ZD1839, gefitinib);
 N-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinazolin-4-amina (Vandetanib)
 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (PD 183805 o CI 1033);
 4-[(1R)-1-feniletilamino]-6-(4-hidroxifenil)-7H-pimolo[2,3-d]pirimidina (PKI-166, CGP 75166 o CGP 59326);
 N-[4-(3-bromoanilino)quinazolin-6-il]but-2-inamida (CL-387785 o EKB-785); y
 4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-3-ciano-6-(4-dimetilaminobut-2 (E)-enamido)-7-etoxiquinolona (EKB-569).
 dihidrocloruro de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-2-propenamida (PD169540).
 La 4-[(3-bromofenil)amino]-6-(metilamino)-pirido[3,4-d]pirimidina conocida como PD-158780
 El hidrocloreuro de 4-[(3-bromofenil)amino]-6,7-dimetoxiquinazolina, conocido como PD 153035.
 La 4-(R)-fenetilamino-6-(hidroxil)fenil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina, conocida como TKI-166.
 GW-2016 también conocido como GW-572016 o ditosilato de lapatinib.

Otras moléculas pequeñas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, que poseen actividad TKI del EGFR incluyen ZD1839, CP 358774, CI 1033, PKI-166, CL-387785 y EKB-569. En realizaciones preferentes, la molécula pequeña que posee actividad TKI del EGFR es gefitinib, verlotinib o AG1478.

En otras realizaciones, la molécula pequeña TKI del EGFR puede ser BE-23372M, BIBX-1382, BBR-1611, naamidina A, AS-23, DAB-720, ADL-681, CGP-52411, CGP-60261, la serie CGP-62706, PKI-166, CP-292597, PD-0158780, RG-13022, RG-14620, RG-50875, AG-1478, VRCTC-310, SU-5271.

Un ejemplo específico de TKI del EGFR de bajo peso molecular que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención puede ser la [6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolin-4-il]-(3-etinilfenil)amina, N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (también conocida como OSI-774, erlotinib o TARCEVA® (erlotinib HCl)).

Otro ejemplo específico de un TKI del EGFR de bajo peso molecular que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención puede ser gefitinib (también conocido como ZD1839 o Iressa®). Iressa es un inhibidor por vía oral activo que bloquea las rutas de transducción de señales implicadas en la promoción del crecimiento del cáncer. Iressa tiene, supuestamente, actividad antiangiogénica, tiene actividad antitumoral frente a tales cánceres como de colon, de mama, de ovario, gástrico, carcinoma amicrocítico de pulmón, pancreático, de próstata y leucemia, elimina la fosforilación de EGFR, HER2 y HER3, inhibe el crecimiento del xenoinjerto de mama humano y se ha utilizado en pacientes. Iressa es una quinazolona y tiene el nombre químico de 4-quinazolinamina, N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxi]-(9CI) y la fórmula química C₂₂H₂₄CIFN₄O₃.

Un ejemplo específico adicional de una TKI del EGFR de bajo peso molecular puede ser el dihidrocloruro de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-2-propenamida (conocido como CI-1033 o PD183805 o Canertinib).

En otras realizaciones, el TKI del EGFR puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede bloquear de forma parcial o completa la activación del EGFR. Los anticuerpos particulares que poseen actividad TKI del EGFR incluyen panitumumab, necitumumab, RG-7160 y nimotuzumab.

En otras realizaciones, el TKI del EGFR puede comprender un compuesto de origen natural. Los compuestos de origen natural particulares que poseen actividad TKI del EGFR o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyen compuestos de kahalalide, por ejemplo los aislados del molusco *Elysia* sp. El kahalalide puede ser uno cualquiera o cualquier combinación de kahalalide A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K y O. En una realización particular el kahalalide puede ser kahalalide F. En algunas realizaciones puede sintetizarse el compuesto de kahalalide.

Métodos in vitro de aumento de la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos *in vitro* de sensibilización de una célula enferma que expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, y medios para el tratamiento de un cáncer que expresa el EGFR.

En el presente documento se describe que el contacto de la célula o el cáncer con el miARN, o un agente que tenga la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7, puede conseguirse mediante cualquier método conocido en la técnica. El contacto de la célula y el miARN se produce *in vivo*. El miARN o agente que tiene la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7 se puede poner en contacto con la célula de forma directa, es decir aplicado de forma directa a una célula que requiere sensibilización a un TKI o, como alternativa, puede combinarse con la célula de forma indirecta, por ejemplo mediante inyección de la molécula en la circulación sanguínea de un sujeto a la cual, después, porta la molécula hasta la célula que requiere sensibilización a un TKI. Adicionalmente, puede retirarse una muestra de un sujeto y combinarse con un miARN o agente que tenga la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7 *in vitro*, antes de devolver al menos una porción de la muestra de vuelta al sujeto. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre que se retira de un sujeto y se combina con el miARN antes de la inyección de al menos una porción de la sangre de vuelta en el sujeto.

El miARN o agente que tiene la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7 se pone en contacto con una célula, en la que los niveles endógenos del miARN son distintos en comparación con la célula antes del contacto con el miARN. El término "endógeno", como se utiliza en este contexto, se refiere a los niveles de expresión y/o actividad "de origen natural" del miARN relevante. Los compuestos o composiciones pueden ponerse en contacto con las células de forma que la expresión y/o actividad del miARN esté aumentada o disminuida en comparación con los niveles "de origen natural".

Los niveles elevados de algunos ligandos del EGFR, por ejemplo de TGF α , son indicativos de resistencia o insensibilidad al TKI (Addison *et al.* (2010) J. Clin Oncol. publicado antes de la edición impresa el 15 de noviembre de 2010 como documento 10.1200/JCO.2010.31.0805). Por consiguiente, en algunas realizaciones la sensibilización de una célula enferma que expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, puede determinarse mediante el análisis de los niveles de ligando del EGFR. Por ejemplo, la administración de miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA a un sujeto, puede cambiar el nivel de expresión de un ligando del EGFR. Las muestras obtenidas a partir de tales sujetos pueden ensayarse mediante cualquier método conocido en la técnica, para determinar el nivel de expresión de un ligando del EGFR en la muestra. Repitiendo el procedimiento de muestreo y ensayo a lo largo del tiempo, se puede controlar y/o comparar el nivel de expresión del ligando del EGFR. Un cambio del nivel de expresión del ligando del EGFR en la muestra puede ser predictivo del nivel de sensibilidad o resistencia del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa. Normalmente, un nivel elevado de expresión de TGF α en células cancerosas con respecto a las células normales es indicativo de resistencia del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa. Por lo tanto, además, normalmente una reducción del nivel de expresión de TGF α en las células cancerosas es indicativo de un aumento en la sensibilidad del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa. El inhibidor de la tirosina quinasa puede ser erlotinib. El ligando del EGFR puede ser TGF α , HB-EGF, anfirregulina, epirregulina, betacelulina, epigén, NRG-1, NRG-2, NRG-3 o NRG-4. En realizaciones particulares el ligando del EGFR es TGF α . La muestra puede ser cualquier muestra biológica, por ejemplo plasma sanguíneo o suero sanguíneo. El inhibidor de la tirosina quinasa puede ser erlotinib.

La administración de los polinucleótidos (por ejemplo miARN) puede ser a través de una estrategia a base de un vector (por ejemplo vírico), o mediante la administración de un polinucleótido en forma de una proteína de fusión en donde el polinucleótido está unido a un fragmento de anticuerpo Fab-protamina que dirige el polinucleótido a las células de interés, es decir, las células que expresan el EGFR.

Enfermedades y afecciones

El EGFR se expresa en células implicadas en muchas afecciones, incluyendo el cáncer. En el presente documento se proporcionan métodos y composiciones para la sensibilización de una célula a un TKI, utilizando el miARN o agente que tenga la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad de un miARN miR-7 descrito anteriormente. Las composiciones y métodos también se pueden aplicar al tratamiento o prevención de las afecciones asociadas con la expresión del EGFR. Las afecciones a las que los métodos y composiciones de la invención se limitan son cáncer. El término "cáncer", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier crecimiento celular maligno o tumor provocado por la división anómala o descontrolada:

El cáncer puede ser cualquier célula que exprese o tenga expresión aumentada del EGFR. Normalmente, tales cánceres estarán asociados con niveles de expresión o actividad del EGFR regulados de forma positiva o elevados, con respecto a las células y tejidos normales. Los cánceres ejemplares incluyen, pero sin limitación, cánceres de hígado, de ovario, de vejiga, uterino, de cuello uterino, colorrectal, de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, de mama, de próstata, pancreático, de riñón, de colon, gástrico, de endometrio, de estómago, nasofaríngeo, faríngeo,

esofágico, de tiroides y de cabeza y cuello, carcinomatosis peritoneal, linfoma, sarcoma o metástasis secundaria del mismo, glioblastoma, neuroblastoma y melanoma.

5 Las dosificaciones eficaces, número óptimo de dosificaciones, espaciado de dosificaciones individuales y cursos
 10 óptimos de tratamiento, pueden determinarse controlando los niveles de suero o plasma de un ligando del EGFR tal
 como TGF α . Por ejemplo, antes de administrar un agente tal como un miARN o un TKI a un sujeto, o del inicio del
 curso de un tratamiento, puede ensayarse una muestra tal como una muestra de sangre, suero o plasma, mediante
 cualquier método conocido en la técnica, para determinar el nivel de ligandos del EGFR. Después de la
 administración del agente, o a intervalos durante el curso del tratamiento, puede tomarse y ensayarse una muestra
 15 adicional para determinar el nivel de ligandos del EGFR. En los casos en donde los niveles de los ligandos del EGFR
 no hayan disminuido, para optimizar la dosificación o el tratamiento puede indicarse una dosis aumentada o una
 frecuencia de dosis aumentada. En los casos en donde el nivel de los ligandos del EGFR haya disminuido, para
 optimizar la dosificación o el tratamiento puede indicarse una dosis aumentada o frecuencia de dosis aumentada.

15 La capacidad para determinar la resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa a base de los niveles de los
 ligandos del EGFR tales como TGF α , también permite un medio útil de selección de pacientes para los que los
 tratamientos en conformidad con la invención pueden ser adecuados.

20 *Composiciones y vías de administración*

20 En el presente documento se describen composiciones para sensibilizar una célula que expresa el EGFR a un
 inhibidor de la tirosina quinasa y para el tratamiento o prevención de una afección asociada con la expresión del
 EGFR. Tales composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente o adecuada, tal como mediante las
 25 vías parenteral (que incluye, por ejemplo, intrarterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea), oral, nasal, mucosa
 (que incluye la sublingual), de forma intracavitaria o tópica. Por lo tanto, las composiciones pueden formularse en
 diversidad de formas que incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones y formas sólidas, y normalmente se
 formulan de forma que sean adecuadas para la vía de administración elegida, por ejemplo como cápsulas,
 comprimidos, comprimidos encapsulados, elixires para la ingestión oral, en una forma en aerosol adecuada para la
 administración mediante la inhalación (tal como mediante inhalación intranasal o inhalación oral), pomada, crema,
 30 gel, gelatina o loción adecuada para la administración tópica, o en una formulación inyectable adecuada para la
 administración parenteral. La vía preferente de administración dependerá de varios factores que incluyen la afección
 a tratar y el resultado deseado. Los expertos en la técnica pueden determinar la vía más ventajosa para cualquier
 circunstancia dada. Por ejemplo, circunstancias en donde se requiera que las concentraciones apropiadas del
 agente deseado se suministren de forma directa al sitio del cuerpo a tratar, la administración puede ser regional en
 35 lugar de sistémica. La administración regional proporciona la capacidad de suministrar concentraciones locales muy
 elevadas del agente deseado en el sitio requerido y, así, es adecuada para conseguir el efecto terapéutico o
 preventivo deseado, mientras se evita la exposición de otros órganos del cuerpo al compuesto y, de este modo, se
 reducir de forma potencial los efectos secundarios.

40 En general, las composiciones adecuadas pueden prepararse de acuerdo con los métodos que son conocidos para
 los expertos en la materia y pueden incluir un diluyente, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los
 diluyentes, adyuvantes y excipientes deben ser "aceptables" en términos de ser compatibles con los otros
 ingredientes de la composición, y no nocivos para el destinatario de la misma.

45 Los ejemplos de diluyentes farmacéuticamente aceptables son agua desmineralizada o destilada; solución salina;
 aceites a base de vegetales tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de
 algodón, aceite de maíz, aceites de sésamo, tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva,
 aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de maní o aceite de coco; aceites de silicona,
 incluyendo polisiloxanos, tales como metil polisiloxano, fenil polisiloxano y metilfenil polisiloxano; siliconas volátiles;
 50 aceites minerales tales como parafina líquida, parafina blanda o escualano; derivados de celulosa tales como metil
 celulosa, etil celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio o hidroxipropilmetilcelulosa; alcoholes
 inferiores, por ejemplo etanol o isopropanol; aralcoholes inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles
 inferiores, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina;
 ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo;
 55 polivinilpirrolidona; agar; carragenanos; goma de tragacanto o goma arábiga, y vaselina líquida. Normalmente, el
 transportador o transportadores formarán del 1 % al 99,9 % en peso de las composiciones.

60 Para la administración como una solución o suspensión inyectable, los diluyentes o transportadores no tóxicos
 parenteralmente aceptables pueden incluir, solución de Ringer, triglicérido de cadena media (TCM), solución salina
 isotónica, solución salina tamponada con fosfato, etanol y 1,2 propilenglicol. Algunos ejemplos de transportadores,
 diluyentes, excipientes y adyuvantes adecuados para el uso oral incluyen aceite de cacahuete, parafina líquida,
 carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, alginato de sodio, goma arábiga, goma de tragacanto, dextrosa,
 sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones orales pueden contener agentes
 65 saborizantes y colorantes adecuados. Cuando se utilizan en forma de cápsula, las cápsulas pueden estar
 recubiertas de compuestos tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, los cuales retrasan la
 disgregación.

Los adyuvantes normalmente incluyen emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas y agentes tamponadores.

5 Las formas sólidas para la administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes disgregantes, diluyentes, saborizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes retardantes. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados pueden incluir sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes disgregantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar, goma de xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato de dicalcio. Los agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, saborizante de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfato de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes retardantes adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

20 Las formas líquidas para la administración oral pueden contener, además de los agentes anteriores, un transportador líquido. Los transportadores líquidos adecuados incluyen agua, aceites tales como aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de maní, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.

25 Las suspensiones para la administración oral pueden comprender adicionalmente agentes de dispersión y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato de sodio o acetil alcohol. Los agentes de dispersión adecuados incluyen lecitina, ésteres de ácidos grasos polioxietilenados tales como ácido esteárico, mono- o di-oleato, -estearato o -laureato de sorbitol polioxietilenados, mono- o di-oleato, -estearato o -laureato de sorbitán polioxietilenados y similares.

35 Las emulsiones para la administración oral pueden comprender adicionalmente uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes de dispersión como se ejemplifica anteriormente, o gomas naturales tales como goma guar, goma arábiga o goma de tragacanto.

40 Los métodos para la preparación de composiciones parenteralmente administrables son evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., incorporado como referencia en el presente documento. La composición puede incorporar cualquier tensioactivo adecuado tal como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico, tal como ésteres de sorbitán o derivados polioxietilenados de los mismos. También pueden incluirse agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceos, y otros ingredientes tales como lanolina,.

45 Los métodos y los transportadores farmacéuticos para la preparación de las composiciones farmacéuticas son bien conocidos en la técnica, como se indica en los libros de texto tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, Williams & Wilkins, Pensilvania, EE.UU. El transportador dependerá de la vía de administración y, otra vez, el experto en la materia será capaz de determinar fácilmente la formulación más adecuada para cada caso particular.

50 Además, las composiciones pueden administrarse en la forma de liposomas. Los liposomas en general se obtienen de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas, y están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multilamelares que están dispersos en un medio acuoso. Puede utilizarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable que tenga la capacidad de formar liposomas. Las composiciones en forma de liposoma pueden contener estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferentes son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica, y se hace referencia específica en relación a esto en: Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, NY (1976), p. 33 y siguientes, cuyos contenidos se incorporan como referencia en el presente documento.

60 *Regímenes de combinación*

65 Las ventajas terapéuticas pueden llevarse a cabo a través de regímenes de combinación. En la terapia de combinación pueden coadministrarse el miARN, o agente que tenga la capacidad de estimular o potenciar la expresión o actividad del miARN, y al menos un agente terapéutico adicional. Por ejemplo, en el contexto del cáncer, se puede buscar mantener las terapias antineoplásicas en curso tales como la quimioterapia y/o la radioterapia, para dirigir la afección del paciente, para mejorar el control local del tumor y/o reducir el riesgo de metástasis, mientras se

emplean agentes en conformidad con las realizaciones de la presente invención. Por consiguiente, las combinaciones de compuestos de la presente invención pueden aplicarse en conjunción con la terapia convencional, tal como con inhibidores de la tirosina quinasa, radioterapia, quimioterapia, cirugía u otras formas de intervención médica. Por "coadministrado" se entiende la administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones distintas a través de la misma o distintas rutas, o la administración secuencial mediante la misma o distintas rutas. Por administración "secuencial" se entiende una diferencia de tiempo entre la administración de las dos formulaciones o terapias de, por ejemplo, segundos, minutos, horas, días, semanas o meses. Las formulaciones o terapias pueden administrarse en cualquier orden.

En un aspecto de la terapia de combinación, un cáncer en el que las células cancerosas expresan o tienen expresión aumentada del EGFR puede tratarse de forma inicial mediante la administración al sujeto de un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA. Después de un período de tiempo, puede ensayarse una muestra biológica procedente del sujeto mediante cualquier método conocido en la técnica, para determinar en la muestra el nivel de expresión y/o actividad de un ligando del EGFR. Repitiendo el procedimiento de muestreo y ensayo al menos una vez a lo largo de un periodo de tiempo de tratamiento, se puede determinar si la expresión y/o actividad del ligando del EGFR cambia a lo largo del periodo de tiempo. Cuando es evidente un cambio del nivel de expresión y/o actividad del ligando del EGFR, puede administrarse un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR y/o su ruta de señalización.

El ligando del EGFR puede ser TGF α , HB-EGF, anfirregulina, epirregulina, betacelulina, epigén, NRG-1, NRG-2, NRG-3 o NRG-4. En realizaciones particulares, el ligando del EGFR es TGF α . La muestra puede comprender plasma sanguíneo o suero sanguíneo. El nivel de expresión del TGF α en la muestra puede ser predictivo del nivel de sensibilidad o resistencia del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa y, por consiguiente, el régimen de tratamiento puede ajustarse. Normalmente, un nivel elevado de expresión de TGF α en células cancerosas con respecto a las células normales, es indicativo de resistencia del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa. El inhibidor de la tirosina quinasa puede ser erlotinib.

El agente (o agentes) terapéutico adicional utilizado dependerá de la afección a tratar o prevenir. Por ejemplo, cuando la afección es un cáncer de cabeza y cuello, los agentes terapéuticos adecuados incluyen erlotinib (Tarecva), gefitinib (Iressa o ZD1839) o AG1478, vandetanib PD 183805, CI 1033, PKI-166, CGP 75166, CGP 59326, CL-387785, EKB-785, EKB-569, PD169540, PD-158780, PD 153035, PKI-166, ditosilato de lapatinib, CP 358774, BE-23372M, BIBX-1382, BBR-1611, naamidina A, AS-23, DAB-720, ADL-681, CGP-52411, CGP-60261, serie CGP-62706, PKI-166, CP-292597, PD-0158780, RG-13022, RG-14620, RG-50875, AG-1478, VRCTC-310, SU-5271.

Los agentes terapéuticos adicionales pueden ser anticuerpos de TKI tales como panitumumab, necitumumab, RG-7160 y nimotuzumab. Los agentes terapéuticos adicionales pueden ser compuestos de origen natural tales como kahalalide F.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, taxol, fluorouracilo, melfalán, cisplatino, oxaliplatino, interferón alfa, vincristina, vinblastina, angiinhibinas, TNP-470, pentosano polisulfato, factor plaquetario 4, angiostatina, LM-609, SU-101, CM-101, Techgalan, talidomida, SP-PG y similares. Otros agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas que incluyen mecloetamina, melfalán, clorambucilo, ciclofosfamida e ifosfamida, nitrosoureas incluyendo carmustina, lomustina, semustina y estreptozocina; alquil sulfonatos incluyendo busulfán; triacinas incluyendo dicarbacina; etileniminas incluyendo tiotepa y hexametilmelamina; análogos de ácido fólico incluyendo metotrexato; análogos de pirimidina incluyendo 5-fluorouracilo, arabinósido de citocina; análogos de purina incluyendo 6-mercaptopurina y 6-tioguanina; antibióticos antitumorales incluyendo actinomicina D; las antraciclina incluyendo doxorubicina, bleomicina, mitomicina C y metramicina; hormonas y antagonistas de hormonas, incluyendo tamoxifeno y corticosteroides y agentes diversos incluyendo cisplatino y brequinar, y regímenes tales como COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato y prednisona), etopósido, mBACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona) y PROMACE/MOPP (prednisona, metotrexato (s/rescate de leucovorina), doxorubicina, ciclofosfamida, taxol, etopósido/mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona).

Los agentes y composiciones divulgados en el presente documento pueden administrarse de forma terapéutica o preventiva. En una aplicación terapéutica, los agentes y composiciones se administran a un paciente que ya padece una afección, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener de forma parcial la afección y sus síntomas y/o complicaciones. El agente o composición debe proporcionar una cantidad del compuesto activo suficiente para tratar de forma eficaz al paciente.

Dosificación

El nivel de dosis eficaz del agente administrado, tal como un miARN o TKI, para cualquier sujeto particular, dependerá de una diversidad de factores que incluyen: el tipo de afección a tratar y la fase de la afección; la actividad y naturaleza del agente empleado; la composición empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y

dieta del sujeto; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de secuestro de los compuestos; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el tratamiento, junto con otros factores relacionados bien conocidos en la medicina.

- 5 Un experto en la materia será capaz, mediante experimentación de rutina, de determinar una dosificación eficaz, no tóxica que podría requerirse para tratar las afecciones aplicables. Estas a menudo se determinarán caso por caso.

10 En general, una dosificación eficaz se espera que esté en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal por 24 horas; normalmente, aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas; o aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas. Más normalmente, se espera que un intervalo de dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por 24 horas.

15 Como alternativa, una dosificación eficaz puede ser de hasta aproximadamente 5000 mg/m². En general, una dosificación eficaz se espera que esté en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 5000 mg/m², normalmente aproximadamente 10 a aproximadamente 2500 mg/m², aproximadamente 25 a aproximadamente 2000 mg/m², aproximadamente 50 a aproximadamente 1500 mg/m², aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 mg/m² o aproximadamente 75 a aproximadamente 600 mg/m². Adicionalmente, será evidente por un experto en la materia que la cantidad óptima y el espaciado de las dosificaciones individuales se determinarán por la naturaleza y la extensión de la afección a tratar, la forma, la vía y el sitio de administración, y la naturaleza del individuo particular a tratar. Además, tales condiciones óptimas se pueden determinar mediante técnicas convencionales.

20 También será evidente para un experto en la materia que el curso óptimo de tratamiento, tal como el número de dosis de la composición proporcionadas por día durante un determinado número de días, lo puede establecer un experto en la materia utilizando las pruebas convencionales de determinación del curso de tratamiento.

25 En referencia a lo anterior, en algunas realizaciones pueden determinarse las dosificaciones eficaces, la cantidad óptima de dosificaciones, el espaciado de las dosificaciones individuales y los cursos de tratamiento óptimos, controlando los niveles en suero y en plasma de un ligando del EGFR, tal como TGF α .

30 La eficacia de un régimen de tratamiento también puede evaluarse determinando en la muestra el nivel de expresión de un ligando del EGFR procedente de un sujeto tratado con una combinación de un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o eficaz para el EGFR y/o su ruta de señalización, y un miARN miR-7, un precursor o variante del mismo, o un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia GGAAGA. Después de un período de tiempo se determina el nivel de expresión de un ligando del EGFR en una muestra adicional procedente del sujeto, y un cambio en el nivel de expresión del ligando del EGFR puede ser indicativo de la eficacia del régimen de tratamiento.

35 El ligando del EGFR puede ser TGF α , HB-EGF, anfirregulina, epirregulina, betacelulina, epigén, NRG-1, NRG-2, NRG-3 o NRG-4. En realizaciones particulares, el ligando del EGFR es TGF α . La muestra puede comprender plasma sanguíneo o suero sanguíneo. El nivel de expresión del TGF α en la muestra puede ser predictivo del nivel de sensibilidad o resistencia del cáncer al inhibidor de la tirosina quinasa y por consiguiente puede ajustarse el régimen de tratamiento. Normalmente, un nivel elevado de expresión de TGF α en células cancerosas con respecto a las células normales es indicativo de resistencia del cáncer a un inhibidor de la tirosina quinasa. El inhibidor de la tirosina quinasa puede ser erlotinib.

50 Ejemplos

Procedimientos experimentales

55 *Productos químicos y reactivos*

El erlotinib (LC Laboratories, Woburn, Massachusetts) se preparó como una solución madre de 23 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) al 96 % (p/p) (Sigma-Aldrich, Sydney, Australia) y agua MilliQ al 4 % (p/p). Las moléculas de precursor de miARN sintético que corresponden a miR-7 humano (precursor de miARN pre-miARN ID de Producto: PM10047) (Ambion, Victoria, Australia) y un miARN de control negativo (miR-CN; control negativo de precursor de miARN pre-miR n.º 1, ID de Producto: AM17110) (Ambion, Victoria, Australia) se prepararon como soluciones madre a 50 μ M en agua sin ARNasa (Ambion, Victoria, Australia). En los experimentos que probaban los efectos de miR-7 y/o erlotinib, los cultivos celulares con control de vehículo se trataron con una dilución equivalente p/p de DMSO (en lugar de erlotinib) o de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Victoria, Australia) (en lugar de miR-7 o miR-CN).

Plásmidos de ADN

Se utilizaron los siguientes plásmidos de ADN: pRL-CMV indicador de luciferasa de Renilla (Promega, New South Wales, Australia) y vector indicador de luciferasa de luciérnaga de 3' UTR de EGFR de informe de pmiR (Webster *et al.*, 2009, J Biol Chem 284: 5731-5741).

Líneas celulares y cultivo celular

Las líneas celulares de CCC FaDu y SCC-9 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Virginia, EE.UU.) y A/Prof. Terrance Johns (Monash Institut MedicalResearch) proporcionó amablemente la línea celular de CCC HN5. Las líneas celulares FaDu y HN5 se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 % en DMEM con baja glucosa (Invitrogen; Victoria, Australia), complementado con suero fetal bovino al 10 % (SFB). La línea celular SCC-9 se cultivó a 37 °C en CO₂ al 5 % en DMEM con baja glucosa (Invitrogen, Victoria, Australia) complementado con suero fetal bovino al 10 % e hidrocortisona 400 ng/ml. Las líneas celulares se utilizaron dentro de los 20 pases del stock inicial para todos los experimentos: para el análisis de la expresión y de la señalización basales de la ruta del EGFR, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad que variaba desde 2,8-4,0 x 10⁵ células por pocillo, y 24 h después de la siembra en placas las células se les restringió el suero durante 24 h en DMEM complementado con SFB al 0,5 %, antes de la extracción de proteínas.

Ensayos de sensibilidad a erlotinib

Las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5,0 x 10³ células por pocillo. 24 h después de la siembra en placas de células inicial, se añadió medio recién preparado que contenía concentraciones variables de erlotinib (0 mM-100 mM). 3 días después de la adición de erlotinib se midió la viabilidad celular utilizando el kit de ensayo de proliferación celular CellTitre 96 Aqueous One Solution (Promega; Sydney, Australia), según las instrucciones del fabricante, y un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Victoria, Australia).

Transfecciones del precursor de miARN y ensayos del gen indicador de luciferasa

Las células se sembraron a una densidad de 4,5 x 10⁵ (FaDu) o 5,0 x 10⁵ (HN5) células en placas de 6 pocillos y se transfectaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Victoria, Australia) con moléculas de precursor miR-7 o miR-CN, a concentraciones finales que variaban de 1-30 nM. A las 24 h se recogieron las células para la extracción de ARN o a los 3 días para la extracción de proteínas. Para las transfecciones de células FaDu, en las que se añadió también erlotinib, las células se sembraron en placa como anteriormente y 3 días después de las transfecciones se añadió erlotinib (7,5 mM) durante 24 h, después de lo cual se recogieron las células para la extracción de proteínas. Para los ensayos del indicador de luciferasa, las células se sembraron a una densidad de 2,0 x 10⁵ células por pocillo en placas de 24 pocillos y se cotransfectaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Victoria, Australia) con moléculas de precursor de miR-7 o miR-CN (1 nM), y 100 ng por pocillo de ADN del indicador de luciferasa de luciérnaga y 5 ng por pocillo de pRL-CMV indicador de luciferasa de Renilla, como control de transfección. 24 h después de la transfección se recolectaron lisados utilizando el tampón de lisis 1X Passive (Promega, Sydney, Australia), se congelaron a -80 °C durante una noche, se descongelaron y se centrifugaron a 13.000 x g durante 5 min. Cada sobrenadante se ensayó para la actividad de luciferasa de luciérnaga y de Renilla, utilizando el sistema de ensayo Dual-Luciferasa Reporter (Promega, Sydney, Australia) y un luminómetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Victoria, Australia). La expresión relativa de luciferasa se determinó normalizando los valores de luciferasa de luciérnaga con respecto a los valores de luciferasa de Renilla.

Extracción de proteínas

Se extrajo proteína a partir de células de placas de 6 pocillos usando tampón de lisis CEB (Giles *et al.*, 2003, J Biol Chem 278: 2937-2946) que contenían inhibidores de fosfatasa PhosSTOP (Roche; New South Wales, Australia) e inhibidores de proteasas sin EDTA Complete (Roche, New South Wales, Australia). Los lisados celulares se congelaron a -80 °C durante una noche, se clarificaron mediante centrifugación a 13.000 x g durante 5 min y se recolectaron los sobrenadantes. Las concentraciones de proteína total se determinaron mediante ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad, New South Wales, Australia), según las instrucciones del fabricante, y un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Victoria, Australia).

Transferencia de Western

Se resolvieron en geles de Bis-Tri al 4-12 % NuPAGE NOVEX (Invitrogen, Victoria, Australia) 20 µg de muestras de proteína total y se transfirieron a membranas de transferencia de Western de PVDF (Roche, New South Wales, Australia). Las membranas se sondearon con anticuerpo monoclonal anti EGFR de conejo (1:5000, Abcam ab52894-100, Massachusetts, EE.UU.), anticuerpo policlonal anti fosfo-EGFR (Tyr1173) de cabra (1:750, Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-12351; California, EE.UU.), anticuerpo policlonal anti Akt de conejo (1:1000, Cell Signalling Technology, Inc. n.º 9272, Massachusetts, EE.UU.), anticuerpo monoclonal anti fosfo-Akt (Ser473) de conejo (1:500, Cell Signalling Technology, Inc. n.º 4060S, Massachusetts, EE.UU.) o anticuerpo monoclonal anti β actina de ratón

(1:15.000, Abcam ab6276-100, Massachusetts, EE.UU.). Antes de la detección con el sistema de detección de transferencia de Western ECL Plus (General Electric Healthcare, Wisconsin, EE.UU.) y ECL-Hyperfilm (General Electric Healthcare, Wisconsin, EE.UU.), se utilizaron los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano picante (1:10.000, General Electric Healthcare n.º NA934V, Wisconsin, EE.UU.), anti IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano picante (1:10.000, General Electric Healthcare n.º NA931V; Wisconsin, EE.UU.) y anti IgG de cabra unido a peroxidasa de rábano picante (1:10.000, Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-2020, California, EE.UU.).

Ensayos de viabilidad celular

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $5,0 \times 10^3$ células por pocillo y se transfectaron con moléculas de precursor de miARN como anteriormente. La viabilidad celular se midió 5 d después de la transfección utilizando el kit de ensayo de proliferación celular CellTitre 96 Aqueous One Solution (Promega, Sydney, Australia), según las instrucciones del fabricante, y un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Victoria, Australia). Las placas de 96 pocillos se fotografiaron utilizando una cámara digital Canon EOS 400D (Sydney, Australia). Para la transfección de las células FaDu, a las que se añadió erlotinib después de la transfección con los precursores de miARN, las células se sembraron en placa como anteriormente y 3 días después de la transfección se añadió erlotinib ($7,5 \mu\text{M}$) durante 4 días, después de lo cual se midió la viabilidad celular (medida en total 7 días después de la transfección).

Análisis por transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR)

Se extrajo ARN total a partir de las células HN5 con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Victoria, Australia) y se trató con ADNasa I (Promega, Sydney, Australia) para eliminar el ADN genómico contaminante. Para el análisis de la expresión de ARNm de EGFR y de GAPDH por qRT-PCR, se transcribieron de forma inversa $0,5 \mu\text{g}$ de ARN total a ADNc, con hexámeros aleatorios utilizando Thermoscript (Invitrogen, Victoria, Australia). La PCR en tiempo real para el ADNc de EGFR y GAPDH se realizó en un instrumento Corbett 3000 RotorGene (Corbett Research, Sydney, Australia) utilizando el kit SensiMixPlus SYBR (Quantace, new South Wales, Australia) y los cebadores para EGFR y GAPDH de PrimerBank (Wang y Seed, 2003, Nucleic Acid Res., 31: e154): EGFR-F, 5'-GCG TTC GGC ACG GTG TAT AA-3' (SEQ ID NO: 6); EGFR-R, 5'-GGC TTT CGG AGA TGT TGC TTC-3' (SEQ ID NO: 7); GAPDH-F, 5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3' (SEQ ID NO: 8); GAPDH-R, 5'-GGG GTC ATT GAT GGC AAC ATT A-3' (SEQ ID NO: 9). Para el análisis adicional de los datos se requirieron curvas de fusión de único pico y eficacias de reacción de $> 0,9$. La expresión del ARNm de EGFR, RAF1 y PAK1 con respecto al ARNm de GAPDH se determinó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak y Schmittgen (2001), Methods 25: 402-408).

Estadística

Todos los resultados se presentan como medias \pm desviación típica (D.T.). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de Student (de dos vías, de datos no apareados) y el nivel de significación se estableció en $p < 0,05$. Para la inmunotransferencia todas las muestras se cargaron en duplicado para validar una carga equivalente de proteína. El análisis estadístico de los datos de qRT-PCR se realizó utilizando el programa informático GenEx (MultiD, California, EE.UU.). La normalidad de los datos se confirmó utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov (prueba KS).

La sensibilidad a erlotinib (CE_{50}) se calculó utilizando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, California, EE.UU.). Se definió que una línea celular sensible tiene una CE_{50} por debajo de erlotinib $5 \mu\text{M}$ y que una línea celular resistente tiene una CE_{50} por encima de erlotinib $5 \mu\text{M}$. La sinergia entre la combinación de miR-7 y erlotinib se evaluó utilizando el modelo de aditividad Bliss (Elia y Flescher (2008), Neoplasia 10: 1303-1313), utilizando la fórmula:

$$E_{\text{bliss}} = E_A + E_B - E_A \times E_B.$$

E_A se definió como la inhibición fraccional obtenida mediante miR-7 solo y E_B se definió como la inhibición fraccional obtenida mediante erlotinib solo. E_{bliss} era la inhibición fraccional que se esperaría si la combinación de miR-7 y erlotinib era aditiva. Si la inhibición fraccional medida de forma experimental era mayor que E_{bliss} , la combinación de miR-7 y erlotinib se decía que era sinérgica.

Ejemplo 1 - Expresión de EGFR y sensibilidades a erlotinib en líneas celulares de CCC

Las líneas celulares de CCC FaDu, SCC-9 y HN5 expresan la ruta del EGFR y poseen una serie de sensibilidades a erlotinib. Para establecer si miR-7 podría utilizarse para regular a sus dianas conocidas, EGFR y Akt activo (P-Akt) (Kefas *et al.*, (2008), Cancer Res 68: 3566-3572; Webster *et al.*, 2009, citado anteriormente) se caracterizó la ruta del EGFR en las tres líneas celulares de CCC para confirmar la expresión de estas dianas. Para la medición de la expresión basal de las moléculas de la ruta del EGFR, se optimizó la cantidad de células sembradas en placa seguido de la restricción de suero en DMEM complementado con suero fetal bovino al 0,5 % durante 24 h. Se recogieron las proteínas, seguido de la inmunotransferencia para EGFR, P-EGFR (EGFR activo), Akt, P-Akt y β

actina, que se utilizó como un control de carga uniforme. Dado que el control de carga de β actina indicó la carga uniforme de proteína, se pudieron hacer las comparaciones de la expresión relativa de la ruta del EGFR (Figura 1A). Las tres líneas celulares de CCC analizadas expresaban dianas de miR-7 de la ruta del EGFR conocidas (Figura 1A). Se demostró que HN5 tenía la expresión relativa de EGFR y la actividad de P-EGFR más elevadas, de acuerdo con trabajos previos (Rusnak *et al.*, (2007), Cell Prolif 40: 580-594). FaDu tuvo expresión de EGFR y actividad de P-EGFR moderadas, y SCC-9 tuvo la expresión de EGFR y la actividad de P-EGFR más bajas, en comparación con HN5. La actividad de P-Akt no fue equivalente a la expresión o la actividad del EGFR. SCC-9 presentó la actividad de P-Akt relativa más elevada, seguido de HN5 y FaDu.

Se determinó la sensibilidad de las células FaDu, SCC-9 y HN5 a erlotinib después de optimizar la cantidad de células para la siembra en placas y utilizando una serie de concentraciones de erlotinib. Se observaron sensibilidades a erlotinib diferenciales, con FaDu clasificada como una línea celular resistente a erlotinib con una CE_{50} de 8,26 μ M y las líneas celulares SCC-9 y HN5 clasificadas como sensibles a erlotinib, con valores de CE_{50} de 2,15 μ M y 0,64 μ M, respectivamente (Figura 1B). Se seleccionaron para la comparación y el uso en experimentos adicionales las líneas celulares de CCC resistentes a erlotinib (FaDu) y las más sensibles a erlotinib (HN5).

Ejemplo 2 - Regulación por miR-7 de la expresión del EGFR en células de CCC

miR-7 regula la expresión del EGFR y la actividad de Akt en células de CCC. Por lo tanto, se investigó el potencial de miR-7 para regular la expresión del EGFR y la actividad de Akt en líneas celulares de CCC. Después de la transfección de células FaDu y HN5 con ya sea reactivo de transfección solo, miR de control negativo (miR-CN) o miR-7 (Ambion), se recogieron las proteínas y se realizó una inmunotransferencia para EGFR, P-EGFR, Akt, P-Akt y β actina, que se utilizó como un control de carga (Figura 2A). Dado que el control de carga β actina indicó una carga uniforme de proteína, pudieron hacerse las comparaciones de la expresión relativa de la ruta del EGFR (Figura 2A). La comparación de los carriles de reactivo de transfección solo y de miR-CN confirmó que miR-7 regulada de forma negativa la expresión del EGFR, de P-EGFR y la actividad de P-Akt, tanto en la línea celular FaDu resistente a erlotinib como en la HN5 sensible a erlotinib (Figura 2A). A continuación, se determinó el efecto de miR-7 sobre la expresión de ARNm de EGFR en las células HN5 abundantes en EGFR después de la transfección con miR-7 o miR-CN y del análisis por qRT-PCR del ARN recogido 24 h postransfección. En comparación con la transfección con miR-CN, la transcripción con miR-7 dio como resultado una expresión de ARNm significativamente reducida (2,92 veces) en las células HN5 de CCC (Figura 2B), lo que sugiere que en las células de CCC, miR-7 se dirige al ARNm de EGFR para la degradación.

Se utilizó un ensayo de indicador de luciferasa para confirmar la actividad de miR-7 sobre sus sitios diana dentro del 3' UTR del EGFR de tipo silvestre de longitud completa en células FaDu (Figura 2C). En muestras tratadas con miR-7 se observó una expresión significativamente reducida de un indicador que contenía el 3' UTR del EGFR de tipo silvestre de longitud completa, en comparación con las muestras tratadas con reactivo de transfección solo o con un control negativo de miARN (miR-CN) (Figura 2C). Esto sugirió que el 3' UTR del EGFR era una diana directa de miR-7 en células de CCC.

Este ejemplo muestra que en las líneas celulares de CCC, HN5 y FaDu, miR-7 puede regular la expresión del EGFR y la actividad de P-Akt a nivel de proteína y de ARN (en el caso del EGFR) (Figura 2A, 2B, 2C), por lo tanto, miR-7 pueden regular de forma simultánea la actividad del EGFR y de P-Akt en líneas celulares de cáncer, incluyendo CCC. Se puede observar que miR-7 se dirige a múltiples miembros de la ruta del EGFR, disminuyendo la viabilidad de una línea celular sensible a erlotinib y aumentando la sensibilidad a erlotinib de una línea celular resistente a erlotinib.

Ejemplo 3 - miR-7 y células de CCC sensibles a erlotinib

Las células de CCC sensibles a erlotinib son sensibles al bloqueo de la ruta del EGFR mediante miR-7. A continuación, se investigó el efecto de miR-7 como un único agente, utilizando la línea celular sensible a erlotinib HN5, que expresa niveles elevados del EGFR, una diana de miR-7 (Figura 1A y Figura 2A). Después de la transfección de células HN5 con el reactivo de transfección solo, con el precursor de miR-CN o con el precursor de miR-7, 5 días después de la transfección se determinó la viabilidad celular a través de un ensayo de título celular. En las células transfectadas con el precursor de miR-7 se observó una disminución significativa y dependiente de la dosis de la viabilidad celular, en comparación con las células transfectadas con el reactivo de transfección solo o con el precursor de miR-CN (Figura 3, gráfico y fotografía de la placa). Con precursor de miR-7 5 nM, hubo una pérdida casi total de la viabilidad de células HN5 (Figura 3, fotografía de la placa).

En la línea celular HN5 sensible a erlotinib, se encontró que miR-7 disminuía la viabilidad celular de una manera dependiente de la dosis (Figura 3) y este efecto se conseguía cuando se utilizaba a 1 nM, 2,5 nM y 5 nM - concentraciones más bajas que las del suero de pacientes tratados con erlotinib (3-10 μ M).

Ejemplo 4 - miR-7 y células de CCC resistentes a erlotinib

miR-7 aumenta la sensibilidad a erlotinib de una línea celular de CCC resistente a erlotinib, y los dos agentes demuestran sinergia cuando se utilizan en combinación. Dado que en líneas celulares de CCC, miR-7 mostró dirigirse tanto a la expresión del EGFR como a la actividad de Akt (véase el Ejemplo 2), se investigó el potencial de miR-7 para aumentar la sensibilidad de la línea celular de CCC resistente a erlotinib FaDu a una concentración subóptima (es decir, por debajo de la CE_{50}) de erlotinib (7,5 μ M). Después de la transfección de las células FaDu con reactivo de transfección solo, el precursor de miR-CN o el precursor de miR-7, 3 días después de la transfección se añadió erlotinib durante 4 días, seguido del análisis de la viabilidad celular por título celular (Figura 4A). Se observó una disminución significativa de la viabilidad celular en células tratadas con precursor de miR-7 y erlotinib en comparación con las tratadas con precursor de miR-CN y erlotinib, lo que indica que la sensibilidad a erlotinib de las células FaDu resistentes a erlotinib había aumentado (Figura 4A). El potencial sinérgico de miR-7 cuando se utilizó en combinación con una concentración subóptima de erlotinib, se determinó utilizando el modelo de Bliss: $E_{bliss} = E_A + E_B - E_A \times E_B$ (Elia y Flescher, 2008, citado anteriormente). E_A se definió como la inhibición fraccional obtenida mediante miR-7 solo, 0,15. E_B se definió como la inhibición fraccional obtenida mediante erlotinib solo, 0,18. Utilizando la ecuación anterior y sustituyendo los valores apropiados, $E_{bliss} = 0,15 + 0,18 - 0,15 \times 0,18 = 0,30$. Por lo tanto, la fracción de inhibición observada de forma experimental se esperaba que fuera de 0,30 si el efecto combinado de miR-7 y erlotinib era simplemente aditivo, y mayor de 0,30 si la combinación de miR-7 y erlotinib era sinérgica. La fracción de inhibición observada de forma experimental cuando miR-7 y erlotinib se utilizaron en combinación fue de 0,61 (Figura 4A). Por lo tanto, la combinación de miR-7 y erlotinib ejerce sobre las células FaDu un efecto inhibitor del crecimiento sinérgico.

Después, se determinó el efecto de miR-7 y erlotinib sobre la expresión y la actividad de la ruta de señalización del EGFR en células FaDu. Después de la transfección de células FaDu con reactivo de transfección solo, precursor de miR-CN o precursor de miR-7, 3 días después de la transfección se añadió erlotinib (7,5 mM) durante 24 h, seguido de la inmunotransferencia para EGFR, P-EGFR, Akt, P-Akt y b actina, la cual se utilizó como un control de carga. Dado que el control de carga de β actina indicó una carga uniforme de proteína, pudieron realizarse las comparaciones de la expresión relativa de la ruta del EGFR (Figura 4B), y reveló que en la línea celular de FaDu erlotinib era capaz de regular de forma negativa la actividad de P-EGFR, de acuerdo con la acción inhibitor de la tirosina quinasa de erlotinib establecida (Specenier y Vermorken, 2007, citado anteriormente, Loeffler-Ragg *et al.*, 2008, citado anteriormente). Además, el tratamiento con erlotinib redujo un tanto también la actividad de P-Akt (Figura 4B). Sin embargo, se observó una mayor regulación negativa de la actividad de P-EGFR y de P-Akt en células FaDu tratadas tanto con miR-7 (que se dirige a la expresión del EGFR y la actividad de Akt) como con erlotinib (que solo se dirige a la actividad del EGFR) (Figura 4B), lo que apuntala la actividad sinérgica del tratamiento combinado con miR-7 y erlotinib.

El uso en combinación de miR-7 y erlotinib en una línea celular resistente a erlotinib reduce la viabilidad celular de una manera sinérgica. Se observó una disminución sinérgica de la viabilidad celular en células resistentes a erlotinib tratadas con miR-7 y erlotinib, en comparación con las tratadas ya sea con miR-7 o erlotinib solos (Figura 4A). La inmunotransferencia reflejó esta tendencia dado que se observó una mayor disminución de la actividad de P-Akt en las muestras tratadas con miR-7 y erlotinib (Figura 4B).

Ejemplo 5 - miR-7 y células de glioblastoma resistentes a AG1478

Los resultados obtenidos con la línea celular de CCC resistente a erlotinib FaDu (Ejemplo 4) se extendieron a células de glioblastoma, de forma específica a las líneas celulares U251, U87 y U373, resistentes a AG1478. Se transfectaron células de glioblastoma (3.000 células por pocillo) con miR-CN o miR-7 (concentración final 10 nM) utilizando reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Después de 2 días, los pocillos se reprovieron con medios que contenían DMSO (vehículo) o el inhibidor de la tirosina quinasa del EGFR AG1478 (7,5 μ M para U251 y U87; o 12,5 μ M para las células U373), y después de 3 días adicionales se evaluó la viabilidad celular utilizando el kit de ensayo de proliferación celular CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega), según las instrucciones del fabricante, y un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

Como se muestra en la Figura 5, en presencia de miR-7 se redujo de forma significativa la viabilidad celular en las tres líneas celulares analizadas, en comparación con miR-CN, y en presencia de miR-7 las células se hicieron sensibles a dosis más bajas de AG1478 que las que fueron eficaces en la reducción de la viabilidad celular en ausencia de miR-7. Estos resultados indican que miR-7 hace resistentes al TKI del EGFR a tres líneas celulares de glioblastoma sensibles al TKI del EGFR AG1478, lo que apuntala la combinación de miR-7 y de un TKI del EGFR como una potencial estrategia terapéutica en el tratamiento del glioblastoma.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Western Australia

65 <120> Métodos y composiciones para aumentar la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa

<130> 20755993
 <150> 2009905758
 <151> 24-11-2009
 5 <160> 9
 <170> PatentIn versión 3.4
 10 <210> 1
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 1
 uggaagacua gugauuuugu ugu 23
 <210> 2
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 2
ugggauugug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa 60
aucgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccau gccucuacag 110
 25 <210> 3
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 3
cuggauacag aguggaccgg cuggccccau cuggaagacu agugauuuug uuguugucu 60
acugcgcuca acaacaaauc ccagucuacc uaauggugcc agccaucgca 110
 35 <210> 4
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 4
agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug 60
uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgcagac ucccuucgac 110
 45 <210> 5
 <211> 6
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 5
 ggaaga 6
 55 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 6
 5 gcgttcggca cgggtataa 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 7
 15 ggcttcgga gatgtgctt c 21

<210> 8
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 8
 25 atggggaagg tgaaggtcg 19

<210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 9
 35 ggggtcattg atgcaacat ta 22 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Western Australia

<120> Métodos y composiciones para aumentar la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa

<130> 20755993

<150> 2009905758
 <151> 24-11-2009

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 <211> 23
 <212> ARN
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 1
 60 uggaagacua gugauuuugu ugu 23

<210> 2
 <211> 110
 <212> ARN

ES 2 608 923 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

5 uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa 60
 aucgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccau gccucuacag 110

<210> 3
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

15 cuggauacag aguggaccgg cuggcccau cuggaagacu agugauuuug uguugucuu 60
 acugcgcuca acaacaaauc ccagucuaac uaauggugcc agccaucgca 110

<210> 4
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

20 agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug 60
 uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgcagac ucccuucgac 110

<210> 5
 <211> 6
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 5
 ggaaga 6

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 6
 gcgttcggca cgggtataa 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 7
 ggcttcgga gatgtgctt c 21

<210> 8
 <211> 19
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 5
 <400> 8
 atggggaagg tgaaggtcg 19
 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 15
 <400> 9
 ggggtcattg atggcaacat ta 22 LISTADO DE SECUENCIAS
 20
 <110> The University of Western Australia
 <120> Métodos y composiciones para aumentar la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa
 <130> 20755993
 25
 <160> 9
 <170> PatentIn versión 3.4
 30
 <210> 1
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 1
 uggaagacua gugauuuugu ugu 23
 <210> 2
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 2
uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa 60
 45
aucgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccau gccucuacag 110
 <210> 3
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 3
cuggauacag aguggaccgg cuggccccau cuggaagacu agugauuuug uuguugucuu 60
 55
acugcgcuca acaacaaauc ccagucuacc uaauggugcc agccaucgca 110
 <210> 4
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 60

ES 2 608 923 T3

<400> 4

agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug 60

uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgcagac ucccuucgac 110

5 <210> 5
<211> 6
<212> ARN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 5
ggaaga 6

15 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 6
gcgttcggca cgggtataa 20

25 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético

35 <400> 7
ggcttcgga gatgttgcct c 21

40 <210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 8
atggggaagg tgaaggtcg 19

50 <210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 9
ggggtcattg atggcaacat ta 22

60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un miARN miR-7, o un precursor del mismo, en el que el precursor se selecciona del grupo que consiste en hsa-miR-7-1, hsa-miR-7-2 y hsa-miR-7-3, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que las células cancerosas expresan o expresan de forma aumentada el EGFR, y de forma opcional en el que el cáncer presenta resistencia a la tirosina quinasa en ausencia de tratamiento.
- 10 2. El miARN miR-7, o precursor del mismo, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer que expresa EGFR se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de cabeza y cuello, un glioblastoma, cáncer de pancreático, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer nasofaríngeo, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón que incluye carcinoma amicrocítico de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de hígado, neuroblastoma o melanoma.
- 15 3. El miARN miR-7, o precursor del mismo, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el inhibidor de la tirosina quinasa se selecciona del grupo que consiste en erlotinib y AG1478.
- 20 4. El miARN miR-7, o precursor del mismo, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el miARN miR-7 es hsa-miR-7 y comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1.
- 25 5. El miARN miR-7, o precursor del mismo, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el precursor del miARN miR-7 comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 4.
- 30 6. El miARN miR-7, o precursor del mismo, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el inhibidor de la tirosina quinasa y el miARN se administran en una composición única, formulados junto con transportadores, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- 35 7. El miARN miR-7, o precursor del mismo, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el inhibidor de la tirosina quinasa y el miARN se administran en composiciones separadas, de forma opcional en el que el miARN se administra antes del inhibidor de la tirosina quinasa.
- 40 8. El miARN miR-7, o precursor del mismo, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tratamiento comprende prevenir o reducir el crecimiento del tumor, la metástasis del cáncer o la reaparición.
- 45 9. Un método *in vitro* para sensibilizar una célula cancerosa a un inhibidor de la tirosina quinasa selectivo o específico para el EGFR, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un miARN miR-7, o un precursor del mismo, en el que el precursor se selecciona del grupo que consiste en hsa-miR-7-1, hsa-miR-7-2 y hsa-miR-7-3 y en el que la célula cancerosa expresa el EGFR.
- 50 10. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la sensibilización hace a la célula susceptible a una dosis citostática o citotóxica del inhibidor de la tirosina quinasa que es más baja que la dosis citostática o citotóxica necesaria en ausencia del miARN.
- 55 11. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que el inhibidor de la tirosina quinasa se selecciona del grupo que consiste en erlotinib y AG1478.
12. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que miARN miR-7 es hsa-miR-7 y comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1.
13. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el precursor del miARN miR-7 comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 4.

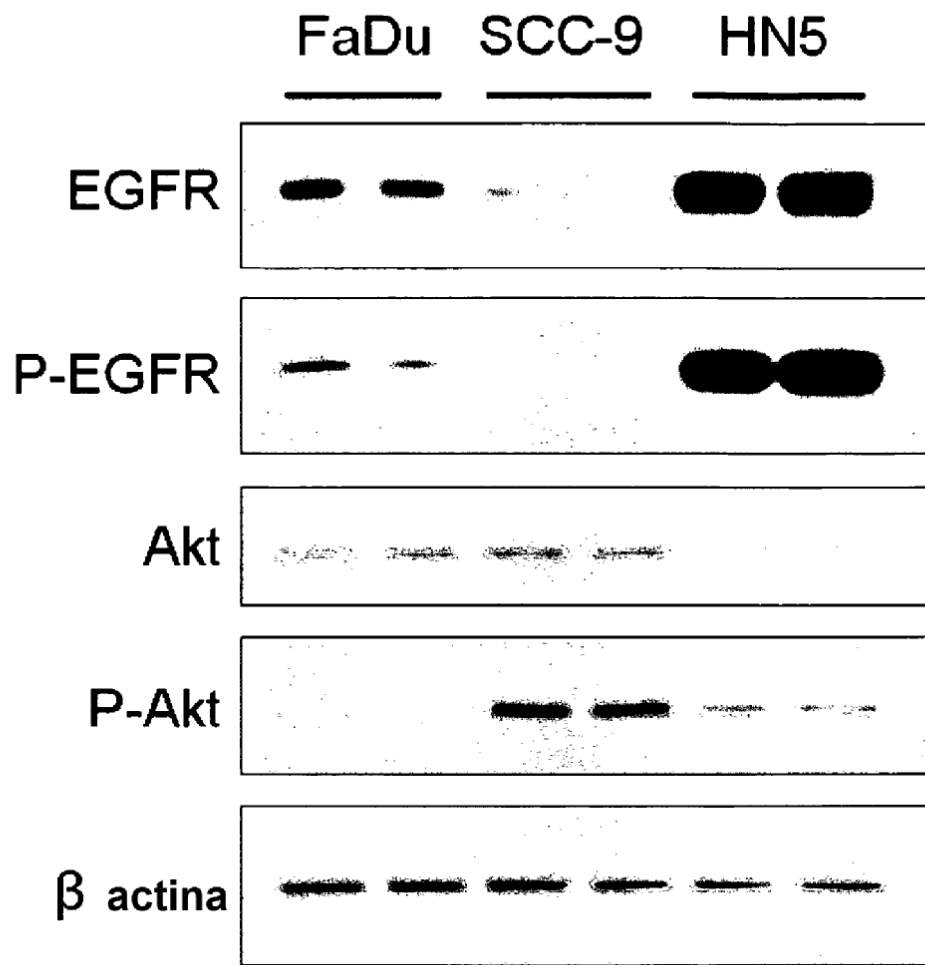


FIGURA 1A

Valores de CE_{50} en CCC

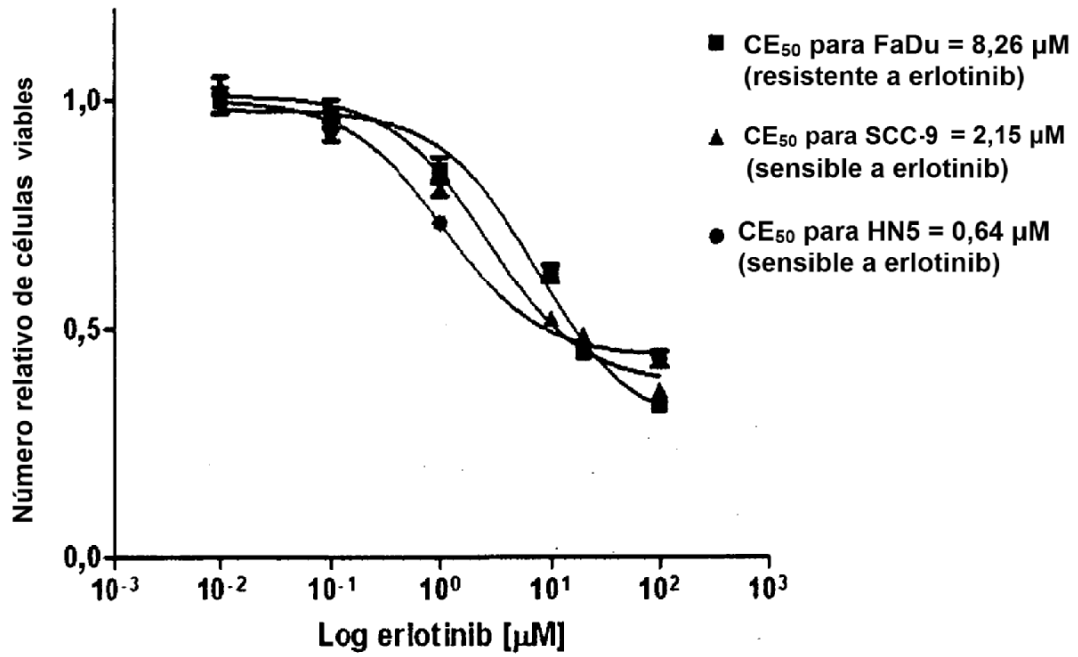


FIGURA 1B

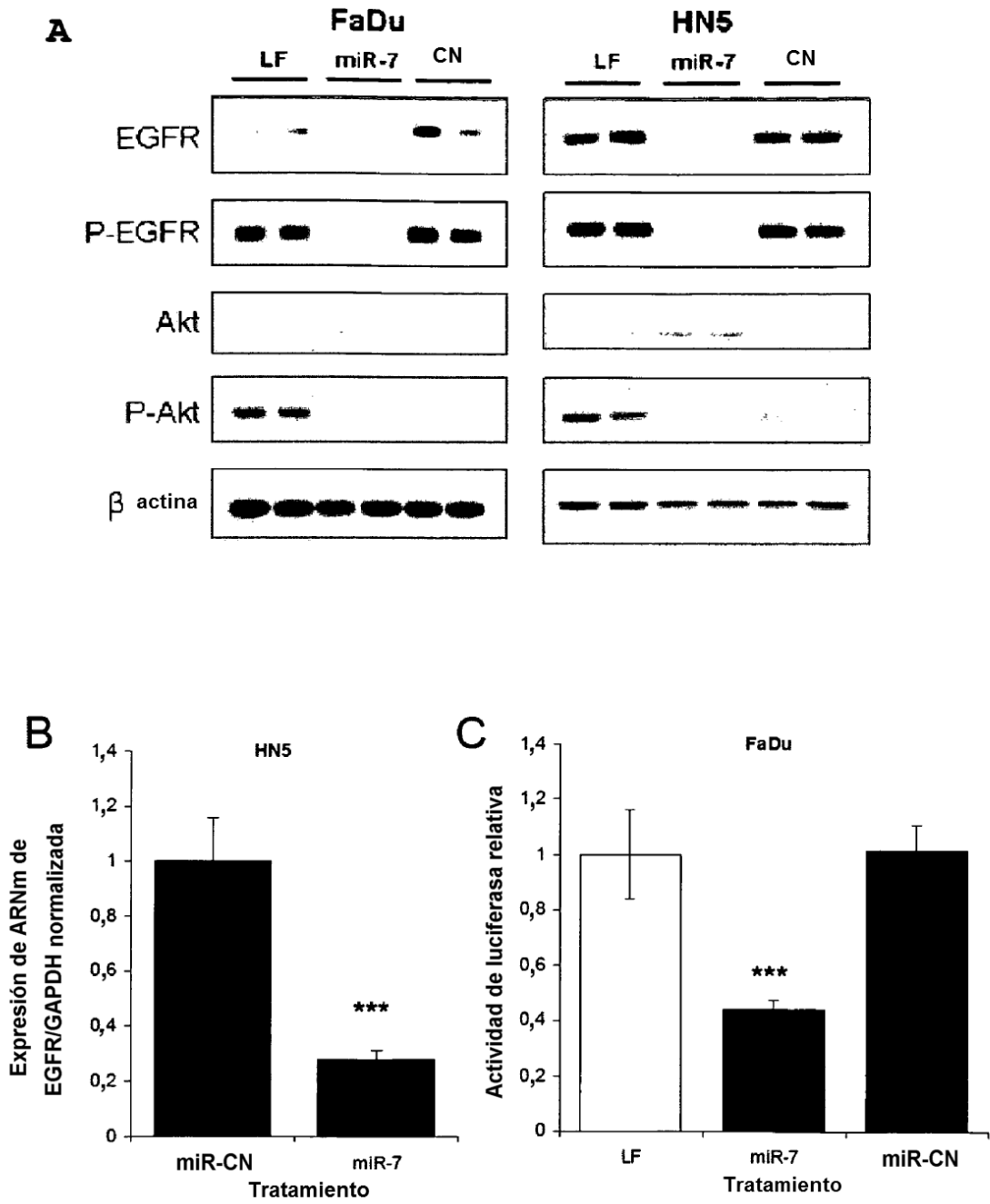
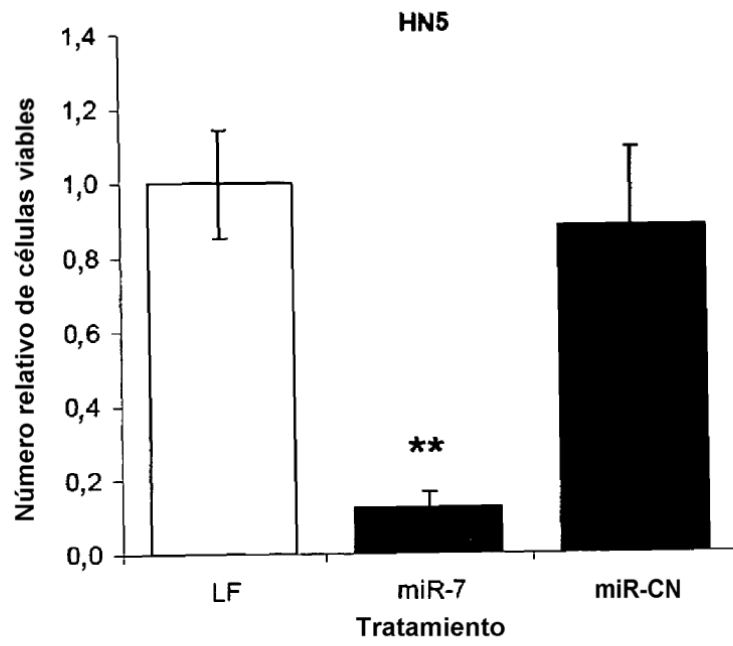


FIGURA 2

A



B

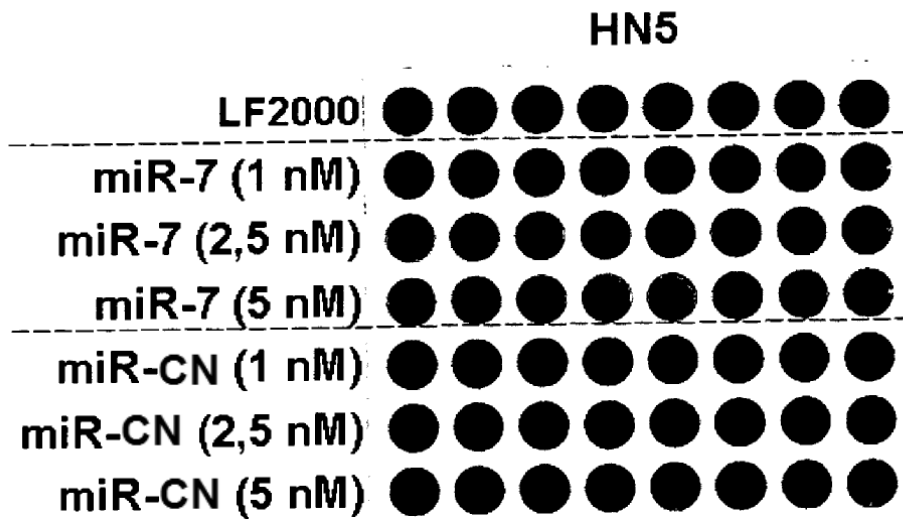


FIGURA 3

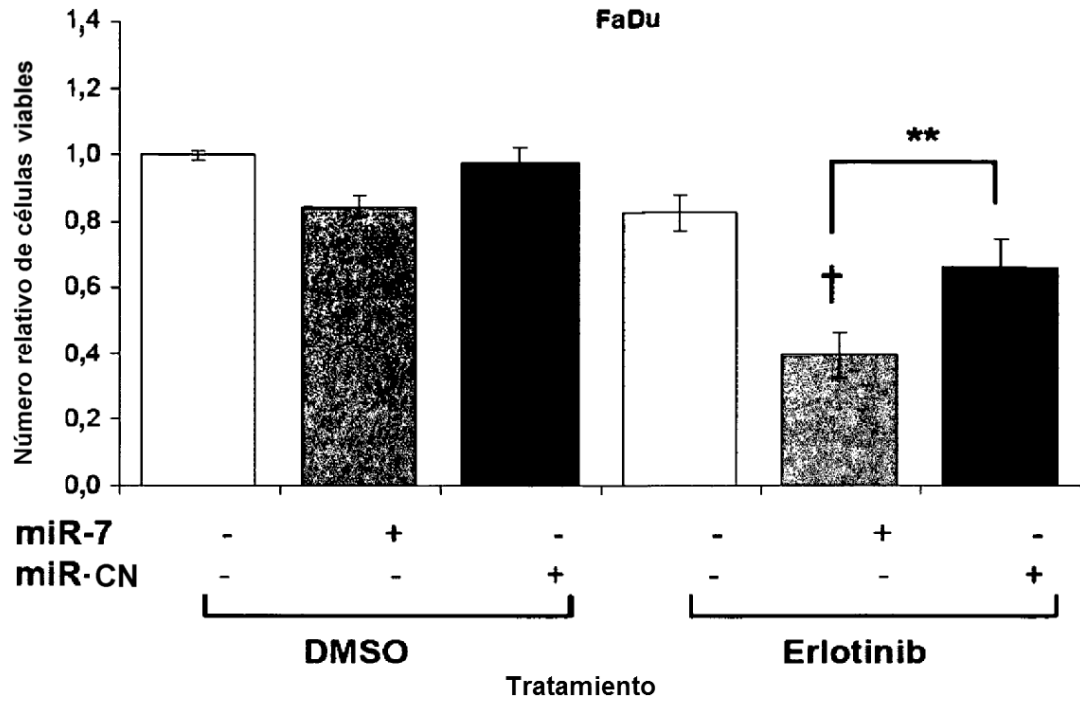


FIGURA 4A

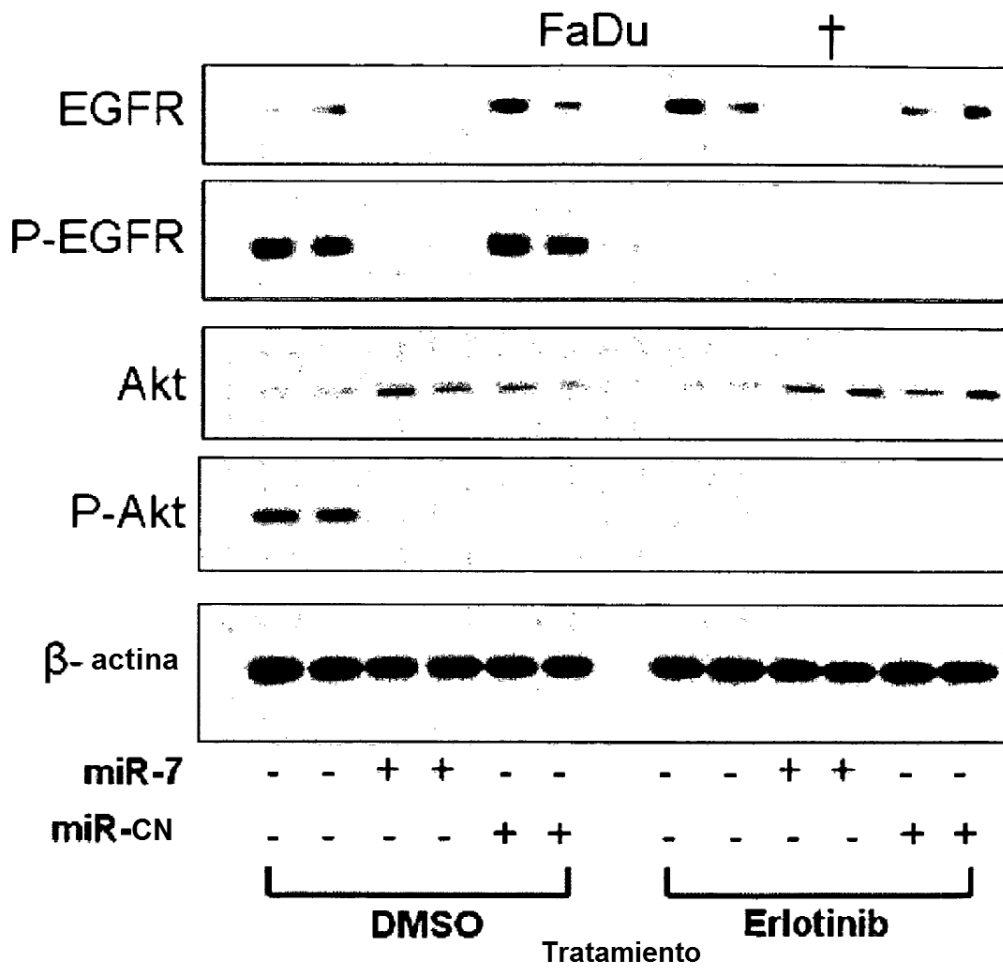
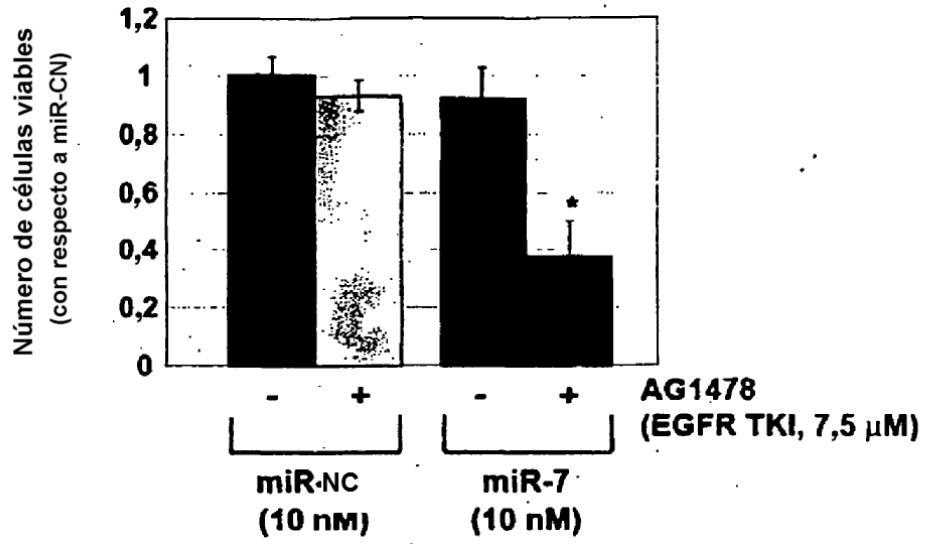


FIGURA 4B

A



B

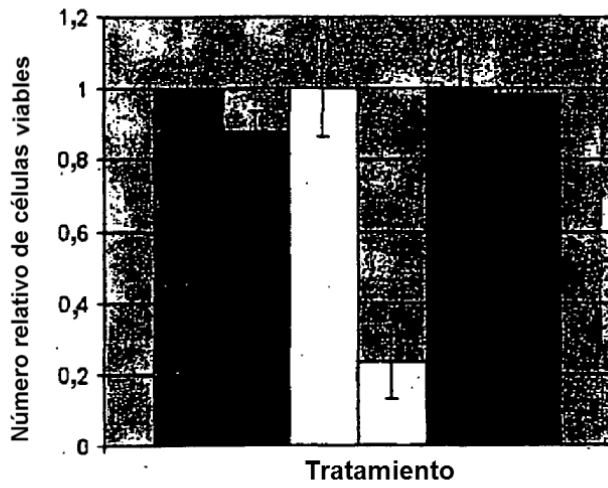


FIGURA 5

C

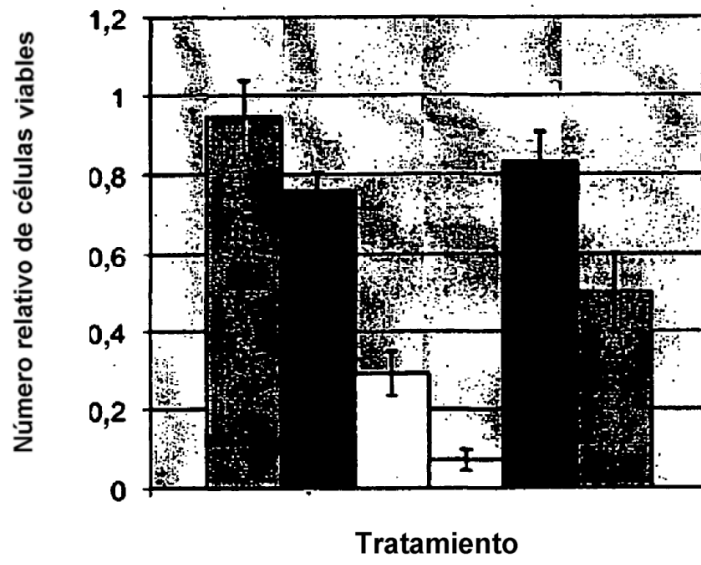


FIGURA 5