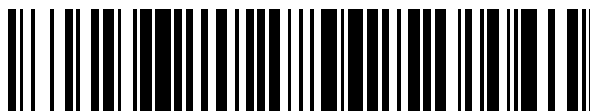


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 824**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2010 PCT/IT2010/000125**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10109511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2010 E 10717306 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2411515**

54 Título: **Uso de MicroRNA-199B-5P en el campo médico y de diagnóstico**

30 Prioridad:

24.03.2009 IT RM20090136

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

05.07.2017

73 Titular/es:

**ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS S.A.
(100.0%)**

**20 rue Diesel
01630 Saint Genis Pouilly, FR**

72 Inventor/es:

ZOLLO, MASSIMO

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 621 824 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

Uso de MicroRNA-199b-5P en el campo médico y de diagnóstico.

5 **[0001]** Esta invención se refiere al uso de MicroRNA-199b-5p en los campos médico y de diagnóstico. Particularmente, esta invención se refiere al uso del miR199b-5p en la terapia contra el cáncer y como un marcador histopatológico y de metástasis.

10 **[0002]** Los MicroRNA (miRNA) son ARN monocatenarios de ~22 nucleótidos de longitud, y constituyen una clase novedosa de reguladores genéticos [1]. En los animales, los miRNA tienen efectos reguladores a través de su unión a sitios complementarios imperfectos dentro de las regiones 3' no traducidas (3'UTR) de sus dianas de ARNm. La expresión alterada de muchos miRNA se observa en varios tipos de tumores: por ejemplo, linfomas de linfocitos B (miR-17 agrupado) [2,3], linfomas malignos (miR-15a, miR-16-1, BCL2 de direccionamiento) [4], tumores de glioblastoma (regulación ascendente de miR-21) [5], neoplasia colorrectal (miR-143, miR-145 regulado en descenso) [6], cáncer de pulmón (miR-29) [7], y cáncer de mama (miR-10b) [8], con varios tipos de tumor adicionales bajo análisis.

20 **[0003]** Los meduloblastomas (MB) son los tumores cerebrales malignos más comunes. Parece que se originan a partir de células madre y de los precursores de neuronas granulares en la capa granular externa del cerebelo [9], o, como alternativa, a partir de los precursores multipotentes en la zona ventricular del cerebelo [10-12]. Desde un punto de vista clínico, los tratamientos multimodales actuales incluyen resección quirúrgica radical seguida de radiación y quimioterapia. Si bien estos tratamientos pueden mejorar la tasa de supervivencia, el MB sigue siendo incurable en aproximadamente un tercio de estos pacientes. La principal causa de muerte es la recidiva asociada a la diseminación tumoral, momento en el que las opciones terapéuticas actuales tienen poca eficacia [13]. Estos tratamientos también son tóxicos y pueden conducir a incapacidades a largo plazo [14-16]. En consecuencia, existe una necesidad sustancial de terapias novedosas, eficaces y de baja toxicidad para niños con meduloblastoma.

30 **[0004]** Las células de MB también pueden contener subconjuntos funcionalmente importantes de células con propiedades tipo células madre que son capaces únicamente de propagar el crecimiento tumoral [17, 18]. Estudios recientes han demostrado que tanto los progenitores como las células madre pueden responder a la ruta Sonic-Hedgehog (Shh) y pueden servir como células de origen para los MB [19].

35 **[0005]** Se ha demostrado que la actividad Notch regula los progenitores de células granulares a partir de los cuales surgen los MB, con el número de copias del gen Notch2 aumentado en el 15 % de los MB [12, 20]. La expresión persistente de *bHLH HES1*, el principal gen de respuesta a Notch, impide tanto la migración de células progenitoras neurales fuera de la zona ventricular como la expresión de los marcadores neuronales [21]. Los ratones que carecen de *Hes1* muestran neurogénesis prematura, visto como la regulación ascendente de los factores de transcripción bHLH neural, lo que da como resultado defectos del tubo neural mayores [22]; las células progenitoras obtenidas a partir de estos ratones han alterado el potencial de auto-renovación, con un compromiso hacia un linaje neuronal [23].

45 **[0006]** Significativamente, la expresión de HES1 en el MB se ha asociado a un peor resultado clínico [24]. Ha de apreciarse que, se ha postulado una interacción con Sonic-Hedgehog (Shh) en el desarrollo de precursores de células granulares [25], ya que tiene intercomunicación con otras rutas, por ejemplo, el gen del grupo panal de abeja *BMI-1* [26].

[0007] El documento WO 2007/081720 describe y reivindica la aplicación de miR-199b para la terapia y diagnóstico de cáncer de pulmón.

50 **[0008]** En el documento WO 2008/094545, se indica y se reivindica la aplicación de un antagonista de miR-199b para la terapia y diagnóstico de leucemia mieloide aguda.

55 **[0009]** Es evidente la necesidad de una nueva intervención médica para la curación del meduloblastoma y para el diagnóstico precoz mediante marcadores histopatológicos y la detección de metástasis. Los autores de esta invención han demostrado que la expresión de miRNA 199b-5p se pierde en pacientes metastásicos y postulan un mecanismo de regulación tras el silenciamiento epigenético a través de procesos de metilación que se producen durante la carcinogénesis, identificando un nuevo marcador molecular para una clase de bajo riesgo en pacientes con MB. La sobreexpresión de MiR-199b-5p bloquea la expresión de varios genes de células madre de cáncer, altera el potencial de injerto de células de MB en el cerebelo de ratones atímicos/sin pelo, y de particular interés, disminuye la subpoblación de células tipo células madre de tumor de MB (CD133+). Por esta razón, puede usarse miR-199b-5p como terapia contra el cáncer, así como un marcador para determinar el estado histopatológico de los tumores y para el conocimiento de la presencia o ausencia de metástasis. Los autores en esta invención han identificado que la expresión de miR-199-5p se pierde en pacientes metastásicos y se postula que esta pérdida se

debe a un mecanismo de silenciamiento durante la carcinogénesis. Los autores han identificado un nuevo marcador molecular para una clase específica de pacientes con meduloblastoma con bajo riesgo de recidiva y enfermedad agresiva. De hecho, miR-199b-5p afecta negativamente a las células madre cancerosas CD133+ que en un modelo animal de cáncer de cerebelo ortotópico de xenoinjerto muestran la alteración del crecimiento y la tumorigénesis *in vivo*, en el cerebelo. Por estas razones, el miR-199b-5p puede usarse en una terapia contra el cáncer, así como para propósitos de diagnóstico como marcador del estado histopatológico de los tumores y para la correlación con respecto a la presencia o ausencia de metástasis como marcador predictivo.

[0010] Los autores en un cribado de líneas celulares de MB, encontraron el miR-199b-5p como regulador de la ruta de señalización de Notch a través de su direccionamiento del factor de transcripción HES1. La regulación descendente de la expresión de HES1 por miR-199b-5p regula negativamente la tasa de proliferación y el crecimiento independiente de anclaje de células de MB. La sobreexpresión de MiR-199b-5p bloquea la expresión de varios genes de células madre de cáncer, altera el potencial de injerto de células de MB en el cerebelo de ratones atímicos/sin pelo, y de particular interés, disminuye la subpoblación de células tipo células madre de MB (CD133+). En el análisis de 61 pacientes con MB, la expresión de miR 199b-5p en los casos no metastásicos fue significativamente mayor que en los casos metastásicos ($P = 0,001$). Los análisis de correlación estadística después de los datos de supervivencia para aquellos pacientes con altos niveles de expresión de miR-199b-5p indican un orden de mejora de tendencia positiva para definir la supervivencia global que para los pacientes de miR-199b-5p de baja expresión de miR-199b-5p. Estos datos que muestran la regulación descendente de miR-199b-5p en los pacientes de MB metastásico sugieren un potencial mecanismo de silenciamiento a través de modificaciones genéticas o epigenéticas. Tras la inducción de agentes de desmetilación (5-aza-desoxicitidina ejemplar), se observó una expresión de miR-199b-5p mejorada en un panel de líneas celulares de MB, que soporta un mecanismo epigenético de regulación de miR-199b-5p. Además, dos líneas celulares de meduloblastoma (Med8 y UV238) muestran un fenómeno significativo de regulación ascendente de miR-199b-5p tras el tratamiento con 5-aza-desoxicitidina. Los autores han creado un modelo ortotópico de xenoinjerto inducido en el cerebelo cerebeloso de ratón donde la infección anterior de un adenovirus que porta miR-199b-5p en células de MB (línea celular Daoy) y su inyección en el cerebelo de ratones atímicos/sin pelo muestran un beneficio clínico a través de la influencia negativa de miR199b-5p en el crecimiento tumoral y especialmente en el subconjunto de células madre de cáncer de MB, proporcionando además pruebas de concepto.

[0011] Por lo tanto, es un objeto específico de la presente invención una secuencia oligonucleotídica que comprende o que consiste en la siguiente secuencia:

**CCAGAGGACACCTCCACTCCGTCTACCCAGTGTTAGACTATCTGTT
CAGGACTCCCAAATTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGCTGGGC
TGGGTTAGACCCTCGG (SEQ ID No: 1)**

o que comprende o que consiste en la secuencia ribonucleotídica correspondiente:

CCAGAGGACACCUCCAGUCCGUCUACCCAGUGUUUAGACUAUCUG
UUCAGGACUCCCAAUUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGGCU
GGGCUUGGUUAGACCCUCGG (SEQ ID No: 10)

o que comprende o que consiste en una parte de la SEQ ID No: 10:

CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC (SEQ IDNO:11)

para su uso en el tratamiento y/o prevención de tumores caracterizada por la expresión del gen CD133, escogido del grupo que consiste en meduloblastoma, linfoma, glioblastoma, carcinoma de colon y carcinoma mamario.

[0012] Particularmente, la secuencia en negrita corresponde a la secuencia miR-199b-5p madura.

[0013] Las secuencias anteriores pueden portarse en seres humanos por un vector vírico (para la secuencia desoxi-ribonucleotídica), por ejemplo, un vector adenoviral, tecnología SNALP (para la secuencia ribonucleotídica), tecnología LNA, o por modificación del grupo O-2-metilo a través del enlace de una molécula de unión de colesterol, o usando un enlazador C₁₋₇. Particularmente, el vector adenovírico puede ser un vector Adv5 con un mapa mostrado en las figuras 15e16, de 6217 pb, promotor de CMV y con sitios de restricción XhoI/HindIII clonados de la secuencia comprendida o compuesta por la secuencia SEQ ID NO:1.

[0014] Un objeto adicional de esta invención es un método de diagnóstico *in vitro* para las evaluaciones del estadio

histopatológico (fase) del tumor o la definición de la presencia o ausencia de metástasis a través de la investigación en una muestra biológica de la expresión de la secuencia comprendida o consistente en la SEQ ID NO:1 junto con uno o más genes expresados en la célula madre de cáncer escogida entre CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3.

[0015] En particular, los tumores pueden seleccionarse dentro del grupo que consiste en carcinoma de colon, meduloblastoma, glioblastoma, carcinoma mamario, linfomas y carcinoma de pulmón; preferiblemente carcinoma de colon, meduloblastoma, glioblastoma, carcinoma mamario y linfoma; y mucho más preferiblemente carcinoma de colon, meduloblastoma, glioblastoma, linfoma.

[0016] De acuerdo con una realización de la invención, el método de diagnóstico de la invención comprende los análisis de expresión de miR199b-5p y de CD133 aplicado al carcinoma de colon, meduloblastoma y glioblastoma. De acuerdo con una segunda realización, el método de diagnóstico comprende los análisis de expresión de miR199b-5p y de HMGA1 aplicado al carcinoma de colon, carcinoma mamario y linfoma.

[0017] Preferiblemente, la detección de la expresión de la secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO:1 puede evaluarse por PCR en tiempo real con los siguientes cebadores para la amplificación:

cebador directo: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)
 cebador inverso: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

y un par de cebadores de control para normalizar el valor de expresión de la secuencia, por ejemplo, los siguientes cebadores:

cebador directo: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)
 cebador inverso: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6).

[0018] Al igual que en un modo alternativo, la detección de la expresión de la secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO:1 comprende o consiste en las siguientes etapas:

a) retrotranscripción del ARN; y b) expresión de dicha secuencia por ensayo TaqMan con los siguientes cebadores y sonda:

cebador directo: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)
 cebador inverso: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)
 sonda: CAGTGTTTAGACTATCTGTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

[0019] De acuerdo con una realización particular de la presente invención, dicho uno o más genes se detectan por PCR en tiempo real por la amplificación de al menos una de las siguientes secuencias:

CD133:

CTATGTGGTACAGCCGCGTGATTTCCCAGAAGATACTTTGAGAAAATT
 CTTACAGAAGGCATATGAATCCAA AATTGATTA (SEQ ID NO: 13)

c-myc: AGGAGGAACAAGAAGATGAGGAAGAAATCGATGTT (SEQ ID NO:14)

Nanog:

GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGCCTCACACGGAGACTGTCTCTCCTC
 TTCCTTCTCCATGGATCTGCTTATTCAGGACAGC (SEQ ID NO:15)

Oct4:

ACTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCCAGCAGCTTGGGCTCGAGAAG
 G

ATGTGGTCCGAGTGTGGTTCTGTAACCGGCGCCA (SEQ ID NO:16)

TCFL1:

CCGCGGGACTATTTGCGCGAAGTGAGAAGGCCTCAGGACAGCGCG
TTCTTT (SEQ ID NO:17)

ZIC1:

5

CAGTTCGCTGCGCAAACACATGAAGGTCCACGAATCCTCCTCGCAGG
GCTC (SEQ ID NO:18)

KLF5:

10

GCATCCACTACTGCGATTACCCTGGTTGCACAAAAGTTTATACCAAGT
CTTCTCA (SEQ ID NO:19)

HMGA1:

15

AAAAACAAGGGTGCTGCCAAGACCCGGAAAACCACCACAACCTCCAG
GAAGG (SEQ ID NO:20)

HMGB3:

20

usando los siguientes pares de cebadores de amplificación:

CD133:

25

Cebador directo: CTATGTGGTACAGCCGCGTG (SEQ ID NO:22)
Cebador inverso: TAATCAATTTGGATTCATATGCCTTC (SEQ ID NO:23)

c-myc

30

cebador directo: ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)
cebador inverso: AACATCGATTTCTCCTCATCTTCTT (SEQ ID NO:25)

Nanog:

35

cebador directo: GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGC (SEQ ID NO:26)
cebador inverso: GCTGTCCTGAATAAGCAGATCCAT (SEQ ID NO:27)

Oct4:

40

cebador directo: ACTGCAGCAGATCAGCCACA (SEQ ID NO:28)
cebador inverso: TGGCGCCGGTTACAGAAC (SEQ ID NO:29)

TCFL1:

45

cebador directo: CCGCGGGACTATTTGCG (SEQ ID NO:30)
cebador inverso: AAAGAACGCGCTGTCTGAG (SEQ ID NO:31)

ZIC1:

50

cebador directo: CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)
cebador inverso: GAGCCCTGCGAGGAGGAT (SEQ ID NO:33)

KLF5:

cebador directo: GCATCCACTACTGCGATTACCC (SEQ ID NO:34)

ES 2 621 824 T3

cebador inverso: TGAGAAGACTTGGTATAAACTTTTGTGC (SEQ ID NO:35)

HMGA1:

5 cebador directo: AAAACAAGGGTGCTGCCAA (SEQ ID NO:36)
 cebador inverso: CCTCCTGGAGTTGTGGTGGT (SEQ ID NO:37)

HMGB3:

10 cebador directo: TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGG (SEQ ID NO:38)
 cebador inverso: TTTCTCTTTCCCGGACATCG (SEQ ID NO:39)

y usando los siguientes pares de cebadores para normalización de la expresión de las siguientes
secuencias génicas:

15 cebador directo: CGT GCT GCT GAC CGA GG (SEQ ID NO:79)
 cebador inverso: GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT (SEQ ID NO:80)

20 **[0020]** Como alternativa, dicho uno o más genes pueden detectarse por TaqMan en tiempo real para la
amplificación de al menos una de las siguientes secuencias:

cd133

TCCACAGAAATTTACCTACATT
GGAAGAGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGCCTGGTCATCTGCT
25 CTCTGCTGACCC (SEQ ID NO:40)

c myc

30 GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTGAAAACCAGCAGCCT
 CCCGCGACGATGCCCTCAACGTTAGCTTACCAACAGGAACTA (SEQ ID NO:41)

nanog:

CCGAAGAATAGCAATGGTGTGACGCAG
AAGGCCTCAGCACCTACCTACCCAGCCTTTACTCTTCCTACCACCA
35 GGGATG (SEQ ID NO:42)

oct 4:

AACCCGGAGGAGGTAGTCCTTTGTTACATGCATGAGTCAGTGAACAG
40 GGAATGGGTGAATGACATTTGTGGGTAGGTTATT (SEQ ID NO:43)

tcfl1:

CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAGAAGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGT
45 CTTTTGTCCGTCAGACTTGATCCTGCTCCCTCGG (SEQ ID NO:44)

zic 1:

CGCGCTCCGAGAATTTAAAGATCCACAAAAGGACGCACACAGGGAGA
50 AGCCCTTCAAGTGCAGTTTGTAGGGCTGTGACC (SEQ ID NO:45)

KLF5:

TTTAACCCACCTCCATCCTATGCTGCTACAATTGCTTCTAACTGGC
 AATTCACAATCCAAATTTACCCACCACCCTGCC (SEQ ID NO:46)

ES 2 621 824 T3

HMGA1:

CCCCAGGCAGACCTTATATGAGACATGGGAGTCCCACCGTATTGTCC
AGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGCA (SEQ ID NO:47)

5

HMGB3:

CGCTATGATCGGGAAATGAAGGATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAA
GAAGAAGAAGGATCCTAATGCTCCCAAAGGCCA (SEQ ID NO:48);

10 usando los siguientes cebadores y sondas para la amplificación:

cd133

cebador directo: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)
cebador inverso: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)
sonda: AGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

15

c myc:

cebador directo: GCTGGATTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)
cebador inverso: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)
sonda: CAGCAGCCTCCCAGCGACG (SEQ ID NO:54)

20

nanog:

cebador directo: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)
cebador inverso: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)
sonda: CAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

25

oct 4:

cebador directo: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)
cebador inverso: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)
sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

30

35

tcf11:

cebador directo: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)
cebador inverso: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)
sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

40

zic 1:

cebador directo: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)
cebador inverso: CGGTCACAGCCCTCAAATC (SEQ ID NO:65)
sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

45

KLF5:

Cebador directo: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)
Cebador inverso: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)
sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

50

HMGA1:

Cebador directo: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)
Cebador inverso: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCTGA (SEQ ID NO:71)
sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

55

ES 2 621 824 T3

HMGB3:

5 cebador directo: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)
 cebador inverso: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)
 sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

y usando los siguientes pares de cebadores y sonda para normalizar la expresión de las secuencias génicas:

10 cebador directo: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)
 cebador inverso: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)
 sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

15 Es un objeto adicional de la presente invención, un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar el estadio histopatológico del tumor y la presencia de las metástasis por la detección, en una muestra biológica, a través de PCR en tiempo real, de la expresión de la secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO:1 y en uno o más genes expresados en las células madre de cáncer escogidas entre CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3 a través de TaqMan en tiempo real, comprendiendo o consistiendo dicho kit en:

20 a) los siguientes cebadores de amplificación de dicha secuencia que comprende o que consiste en SEQ ID NO:1:

 cebador directo: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3) cebador inverso:
 CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

25 b) un par de cebadores de control para la normalización del valor de expresión de dicha secuencia;

 c) uno o más de los siguientes pares de cebadores y sondas correspondientes para revelar la secuencia de dicho uno o más genes:

30 cd133

 cebador directo: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)
 cebador inverso: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)
 sonda: AGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

35 c myc:

 cebador directo: GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)
 cebador inverso: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)
 sonda: CAGCAGCCTCCCAGCAGC (SEQ ID NO:54)

40 nanog:

45 cebador directo: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)
 cebador inverso: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)
 sonda: CAGCACCTACCTACCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

50 oct 4:

 cebador directo: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)
 cebador inverso: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)
 sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

55 tcfl1:

 cebador directo: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61) cebador inverso:
 CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)
 sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

60 zic 1:

 cebador directo: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)
 cebador inverso: CGGTCACAGCCCTCAAATC (SEQ ID NO:65)
 sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

KLF5:

5 Cebador directo: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)
Cebador inverso: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)
Sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

10 Cebador directo: CCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)
Cebador inverso: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCTGA (SEQ ID NO:71)
Sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

15 cebador directo: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)
cebador inverso: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)
sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

20 d) los siguientes cebadores y sonda para normalizar la expresión de la secuencia de dichos genes:

25 cebador directo: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)
cebador inverso: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)
sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

En particular, los cebadores de control presentados en b) para normalizar la expresión de la secuencia pueden ser los siguientes:

30 cebador directo: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)
cebador inverso: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

35 Además, la invención se refiere a un kit de diagnóstico *in vitro*, para evaluar el estadio histopatológico de tumor y la presencia de las metástasis mediante la detección a través de ensayo TaqMan, en una muestra biológica, comprendiendo o consistiendo la expresión de la secuencia en la SEQ ID NO:1, y en uno o más genes expresados en las células madre de cáncer seleccionadas entre CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3, comprendiendo y consistiendo dicho kit de diagnóstico en:

40 a1) los siguientes cebadores y la sonda para la detección de la expresión de dicha secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO:1

45 cebador directo: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)
cebador inverso: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)
sonda: CAGTGTTTAGACTATCTGTTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9);

b1) uno o más pares de los siguientes cebadores y as sondas correspondientes para la detección de la expresión de dicho uno o más genes:

50 cd133

cebador directo: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)
cebador inverso: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)
sonda: AGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

55 c myc:

cebador directo: GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)
cebador inverso: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)
sonda: CAGCAGCCTCCCGCAGC (SEQ ID NO:54)

60 nanog:

cebador directo: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)

cebador inverso: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)
sonda: CAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

5

cebador directo: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)
cebador inverso: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)
sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

10

tcf1:

cebador directo: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)
cebador inverso: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)
sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

15

zic 1:

cebador directo: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)
cebador inverso: CGGTCACAGCCCTCAAATC (SEQ ID NO:65)
sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

20

KLF5:

Cebador directo: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)
Cebador inverso: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)
Sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

25

HMGA1:

Cebador directo: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)
Cebador inverso: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCGA (SEQ ID NO:71)
Sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

30

HMGB3:

cebador directo: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)
cebador inverso: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)
sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

35

40 c1) el siguiente par de cebadores y sondas para la normalización de la expresión de la secuencia de los genes indicados anteriormente:

cebador directo: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)
cebador inverso: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)
sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

45

[0021] Esta invención se describirá a modo de ilustración, pero no de manera limitativa, por su forma preferida de realización, con relación a las figuras adjuntas en las que:

50 La Figura 1 muestra la función *in vitro* de miR199b-5b sobre la proliferación y diferenciación de células de MB Daoy.

55 A) Análisis FACS representativo con yoduro de propidio que muestra una disminución en los porcentajes de células en estadio S y un aumento en G0-G1 para el clon estable 199bSC1. La ausencia de señales de saliente con el pico de color rojo G0-G1 en los clones 199bSC1 y 199bMC1 excluye los procesos apoptóticos. B) Ensayos de proliferación mediante sal de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-5-3-carboximetoxifenil-2-4-sulfofenil-2H-tetrazolio (MTS), mostrando tasas de proliferación disminuidas del clon 199bSC1 estable (triángulos de color rojo) y el clon 199bMC1 (cruces de color verde), en comparación con el clon estable con el vector vacío en solitario (rombo de color azul). Este efecto de la sobreexpresión de miR-199b-5p se redujo mediante la transfección de 2-OM (cuadrados de color rosa). Los datos mostrados son medias \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. C) Expresión de ARNm de diferenciación representativa (por ejemplo, MASH1, MATH3 y NEUROGENINA 2) y los marcadores de

60

proliferación (por ejemplo, c-MYC, CICLINA D1) tras la sobreexpresión de miR-199b-5p, como se reveló por PCR en tiempo real, comparando los clones estables 199bSC1 y 199bMC1 con células de tipo silvestre. D) El clon estable 199bSC1 para miR-199b-5p muestra la formación de colonias alteradas en ensayos de soft-agar. La gráfica muestra colonias contadas como medias \pm DE de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. E) La transferencia Western representativa que usa los anticuerpos anti-c-Myc y anti-ciclina D1 muestra que estas dos proteínas que se regularán en sentido descendente en el clon estable 199bSC1; véase también el análisis densitométrico en el panel derecho. F) Igual que para E, que muestra las proteínas GABRA6 y MATH3 reguladas en sentido ascendente después de la expresión de miR-199b, lo que sugiere la inducción de la diferenciación. Se usaron anticuerpos anti-Laminina- β para normalizar la expresión nuclear de las proteínas c-Myc y ciclina D1. Se usaron los anticuerpos anti- β -actina para normalizar la expresión de las proteínas citoplásmicas GABRA6 y MATH3.

La Figura 2 muestra que la sobreexpresión de miR-199b-5p disminuye el compartimiento CD133+ de células Daoy.

A-F) Los análisis FACS representativos de los clones estables 199bSC1 (D) y 199bMC1 (F) mostraron una disminución en el porcentaje de células que eran positivas para el marcador de células madre CD133 (B); A, C y E son controles negativos (sin anticuerpos).

La Figura 3 muestra que los efectos de la sobreexpresión de miR-199b-5p se invierten mediante la transfección de HES1.

A) Transferencia Western representativa y un análisis densitométrico que muestran que el rescate de la expresión de HES1 por sobreexpresión del ADNc de HES1 en el clon estable 199bSC1 restaura la expresión de ciclina D1. B) Ensayo de proliferación mediante sal de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-5-3-carboximetoxifenil-2-4-sulfonil-2H-tetrazolio (MTS) que muestra una mayor velocidad de proliferación del clon estable 199bSC1 con expresión de HES1 (cuadrados de color azul oscuro), en comparación con el clon estable 199bSC1 en solitario (rombos de color azul claro). Los datos mostrados son medias \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. C) Expresión de ARNm representativa de diferenciación (por ejemplo, MASH1, MATH3 y NEUROGENINA 2) y marcadores de proliferación (por ejemplo, c-MYC, CICLINA D1) tras el rescate celular con HES1 en el clon estable 199bSC1, comparando las células de tipo silvestre, como se revela por PCR en tiempo real. La expresión de GABRA 6 y MAP2 está regulada en descenso en el experimento de rescate. D) El análisis FACS representativo del clon estable 199bSC1 que expresa HES1 muestra un aumento en la fracción de células en estadio S, y una disminución en G1, con respecto al clon estable 199bSC1 en solitario. E-H) El efecto de la expresión de miR-199b-5p en el SP de las células Daoy se invierte por la reexpresión de HES1. El clon estable 199bSC1 se transfirió con ADNc de HES1 y un plásmido codificante de GFP, después se trató después de 48 horas con Hoechst y verapamilo (E-F) o Hoechst en solitario (G-H) y se analizó mediante FACS. Las células positivas para GFP (selección de poblaciones P5), panel E y G, se analizaron para determinar la presencia de células que excluían el colorante (F-H, selección de poblaciones P6). Las células negativas para GFP no transfectadas (selección de poblaciones P3), no se analizaron.

La Figura 4 muestra la disminución de la tumorigenicidad de las células Daoy que sobreexpresan miR-199b-5p.

A) Experimento de xenoinjerto durante nueve semanas, tras la inyección s.c. de cinco ratones con células Daoy de control (lado CTR) y células Daoy que sobreexpresan miR-199b-5p (lado 199b). Con las células CTR, los tumores fueron detectables macroscópicamente en 5/5 ratones; con células de sobreexpresión, en ratones 3/5. La diferencia de volumen tumoral total entre los lados inyectados con CTR y 199b después de nueve semanas de crecimiento era estadísticamente significativa, como se indica (media \pm DE). B) Emisión de fotones del ratón n.º 4 después de nueve semanas de crecimiento tumoral. El lado 199b (199bLuc-1) tenía una emisión de fotones consistentemente inferior que el lado de control (Ctl-Luc-4). También se muestran las comparaciones de las dimensiones tumorales. C) Cuando la emisión de fotones (véase B) se convirtió en el número de célula; uno de los cinco ratones no mostró que no había diferencias significativas (media \pm DE) (prueba t no emparejada de dos colas). D) Emisión de fotones de 3 ratones inyectados en el cuarto ventrículo con respectivamente: 199bLuc-1, Ctl-Luc-4 infectado con AdV5 mock y Ctl-Luc-4 infectado con AdV5 de miR-199b-5p. E) Cerebro entero del animal y sitio de inyección (flecha de color blanco). Tinción con hematoxilina/eosina del cerebelo; flecha de color negro, sitio de inicio de la tumorigénesis. F) BLI de ratones inyectados como para D, después

de un mes de crecimiento tumoral. Las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas. G) BLI de dos ratones seleccionados que muestran el desarrollo de la carga tumoral con Ctl-luc4-AdV5-Mock#7, y reducción con Ctl-luc4-AdV5-199b#3 en el tiempo (0-8 semanas). H) Tinción con hematoxilina-eosina del cerebelo de los animales AdV5-Mock#2 y AdV5-199b#3 10 semanas después de la inyección ortotópica, que muestra células tumorales que rodean la capa granular externa y dentro del ventrículo IV (estrella de color blanco). En color azul, tinción DAPY, junto con la detección de GFP. Ampliación como se indica.

La Figura 5 muestra la formación de imagen molecular de alta resolución de células de MB xenoinjertado inyectadas en el cerebelo.

Imágenes de fusión PET-CT de ratones AdV5-Mock#7 (A) y AdV5-199b#5 (B) a las 12 semanas de la cirugía e inyección, con representación del volumen tridimensional y visualización simultánea de áreas de captación de FLT (azul-verde, flechas de color blanco). Es evidente un defecto óseo más ancho en la porción occipito-parietal del cráneo en el ratón AdV5-Mock#7. Abajo: Tabla de medidas (cm³) de la masa tumoral experimentada con la adquisición de PET-CT (como se describe en Material complementario).

La Figura 6 muestra los niveles de expresión de miR199b en cerebelo humano y en tumores, y la correlación con el pronóstico.

A) Diagrama de cajas de los niveles de expresión de miR-199b-5p en cerebelos humanos sanos en los dos intervalos de edad indicados. MiR-199b-5p mostró mayor expresión en explantes de controles más jóvenes (prueba de Mann-Whitney, P = 0,006). B) Casos que expresan altamente MiR-199b-5p son en su mayoría M0 P = 0,001 (prueba de ji-cuadrado de Pearson). C) Estimaciones de supervivencia de Kaplan-Meier comparando pacientes con niveles bajos frente a altos (relativos a la media) de expresión de miR-199b-5p (45 pacientes con datos de seguimiento disponibles). D) Expresión de MiR-199b-5p por PCR en tiempo real en un panel de cinco líneas celulares de MB no tratadas o tratadas con 5-Aza-C (DAC/+); la desmetilación inducida por transcripción de miR-199b-5p en dos líneas celulares: med8a y uw228. E) La interacción entre miR-199b-5p y la ruta Notch.

Los pacientes M0 y M+ muestran diferentes niveles de expresión de miR-199b-5p, que podrían impulsarse por un mecanismo epigenético. Lado izquierdo: En condiciones de expresión de miR-199b-5p inducida (1), los niveles de HES1 disminuyen, aliviando la inhibición de los bHLH neurogénicos (2). Esto a su vez promueve un programa neurogénico y una disminución en la proliferación, células SP y CD133+ (3). Lado derecho: En condiciones de baja expresión de miR-199b-5p, los niveles de HES1 son mayores (1), reprimiendo los genes pro-neurales bHLH, con un consiguiente aumento de la proliferación, SP y un agrandamiento del compartimento de CD133+ (4).

La Figura 7 muestra la asociación de la expresión de miR199b-5p con la supervivencia de los pacientes con MB: el análisis de Kaplan-Meier muestra los pacientes con bajo nivel de miR199b-5p con respecto a pacientes con niveles altos (percentil a 33° y 66°) de Mir-199b-5p (datos de seguimiento para 90/108 pacientes disponibles).

La Figura 8 muestra la asociación de la expresión de miR199b-5p con la supervivencia de los pacientes con MB: el análisis de Kaplan-Meier muestra los pacientes con bajo nivel de miR199b-5p con respecto a pacientes con niveles altos (percentil a 33° y 66°) de Mir-199b-5p (datos de seguimiento para 90/108 pacientes disponibles).

Figura 9. A) Transferencias Western representativas de la transfección transitoria de células HEK293 con construcciones de expresión para miR-199b-5p y miR-199a. La sobreexpresión de MiR-199b-5p redujo los niveles de la proteína HES1 endógena; por el contrario, miR-199a indujo un aumento en los niveles de HES1 48 h después de la transfección. Derecha: Cuantificación a través de análisis densitométricos. A) Transferencia Western representativa a partir de la transfección transitoria de células D283 con construcción de expresión para miR-199b-5p y usando un vector vacío. De nuevo, la sobreexpresión de miR-199b-5p redujo los niveles de la proteína HES1 endógena. Por debajo de una cuantificación a través de análisis densitométricos. C) Las células D283 y SH-SY5Y expresan niveles similares de miR-199b-5p y miR-124a, sabiéndose que estos últimos se expresan preferiblemente en el sistema nervioso central. Por el contrario, las células D283Med mostraron niveles considerablemente más bajos de miR-199b-5p. Los datos mostrados son medias ± DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. D) Perfiles de expresión representativos de MiR-199b-5p a través de un panel de tejidos humanos (Ambion); se expresó MiR-199b-5p en diferentes grados, con una expresión relativamente alta en el duodeno, ganglios linfáticos, pulmón, músculo esquelético, ventrículo derecho (más alto), riñón, corazón total y tiroides.

Efectos del MiR-199b-5p en la 3'UTR de su gen diana putativo, HES1.

E-F) Actividad de luciferasa de un vector indicador que contiene la 3'UTR de HES1 de tipo silvestre y 3'UTR de HES1 mutada en el sitio de unión a miR-199b, co-transfectada o no con un vector de expresión para miR-199b-5p. La luciferasa de la actividad de 3'UTR de tipo silvestre se redujo en un 50 % con la expresión de miR-199b-5p, mientras que el 2'-O-metil-oligoribonucleótido (2-OM; 400 nM) bloquea este efecto. No hay ningún efecto con el miR-199b-5p junto con la 3'UTR de HES1 mutada en el sitio de unión. Se muestra un experimento representativo donde los datos son medias \pm DE de tres réplicas en las líneas celulares HEK293 y Daoy, respectivamente. G-I) Pre-miR-199 se clonó y se transfectó en las células Daoy, y se evaluaron tres clones estables para la expresión de HES1 por qRT PCR y transferencia Western. Hubo una disminución significativa en los niveles de proteína HES1, como se reveló usando un anticuerpo policlonal anti-HES1; el descenso también se reveló por análisis densitométrico (G, panel derecho) H) Se transfectó un 2'-O-metil-oligoribonucleótido (2-OM) dirigido contra miR-199b-5p en el clon estable 199bSC1, con una transferencia Western representativa y la cuantificación por análisis densitométrico que muestra la expresión de HES1 restaurada. Los datos de cuantificación mostrados son medias \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Figura 10. Expresión de Mmu-miR-199b en cerebelo embrionario de ratón y regulación de otras dianas potenciales por miR-199b-5p humano.

A) La expresión de ARNm *in situ* de Mmu-miR-199b es detectable en E14.5 y en el cerebelo de ratón recién nacido (p0). La tinción era difusa, y en todas las áreas del cerebelo; la expresión disminuyó de E14.5 a p0. Se usó Mmu-miR-124a (un miRNA específico del cerebro) como control. Izquierda: ampliación, 50X; Derecha: ampliación, 200X. B) Cuantificación de la disminución en la expresión de mmu-miR-199b durante el desarrollo del ratón y la diferenciación del cerebelo. Los niveles de expresión de miR-199b-5p maduro se dan en relación con let-7A, con los datos mostrados como medias \pm DE a partir de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. C) Transferencia Western representativa que muestra los niveles de proteína de GSK3- β que se predice que es una diana, en el clon estable miR-199b-5p de mayor expresión. Los niveles de GSK3- β no se regularon en descenso, y en su lugar se aumentaron ligeramente, como se desprende de la cuantificación por el análisis densitométrico mostrada en el panel derecho, donde los datos mostrados son medias \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado D) Se predice que MiR-199b-5p se une a otras UTR (véase la Tabla complementaria S1). Cuando se examinó la sobreexpresión de miR-199b-5p en células Daoy para determinar la regulación en descenso de la traducción productiva de un gen indicador que portaba las 3'UTR de longitud completa indicados, se observó que ninguna de ellas estaba afectada. Los datos mostrados son medias \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. E) Ensayos de motilidad celular comparando la línea celular 199bSC1 con la línea CTR (control) de vector vacío de Daoy usando un sistema de cámara Boyden (FBS al 0,5 % como quimioatrayente). Las células de mayor motilidad se fijaron y se tiñeron con hematoxilina y se contaron bajo el microscopio. Los datos mostrados son medias \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado, e indican que no hay diferencias entre el control (CTR) y la línea celular 199bSC1. F) Ensayo de proliferación (MTS) de las células D283MED y ONS76 que sobreexpresan miR-199b-5p después de transfecciones transitorias, como se indica. Las células D283MED transfectadas con 199b-5p (rombos de color azul) muestran una reducción apreciable en la proliferación celular, en comparación con la transfección, de vector vacío de control (triángulos de color verde). Las células ONS76 muestran una velocidad de proliferación más alta que, sin embargo, no se ve afectada por el transfectante 199b-5p (comparar cruces de color naranja de transfección de vector vacío con cuadrados de color púrpura). Los datos mostrados son medias \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. G) El silenciamiento de la expresión endógena de miR-199b-5p a través de la transfección de un oligoribonucleótido antisentido 2-O-metil (2-OM-a) conduce a un aumento de la proliferación de células Daoy, aliviando probablemente el control del miR-199b-5p endógeno sobre la 3'UTR de HES1. Los datos mostrados son medias \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Figura 11. Análisis de FACS para el papel de miR-199b-5p en la población de células Daoy.

A, C, E) Disminución de las células SP del clon estable Daoy 199bSC1, según se determina por tinción con Hoechst 33342. B, D, F) Adición de verapamilo para forzar la incorporación del colorante también en las células SP. Las células Daoy mostraron una fracción al 5,2 % de las células SP, mientras que los clones estables 199bSC1 y 199bMC1 que sobreexpresan miR-199b-5p no muestran niveles significativos de células SP (0,2 %, 0,4 %, respectivamente).

Figura 12. Creación de células Daoy bioluminiscentes que sobreexpresan miR-199b-5p para estudios *in*

vivo.

El clon estable Daoy con el vector vacío (Ctl) y el clon estable Daoy que sobreexpresa miR-199b-5p (199b) se transfectaron con un vector de expresión de luciferasa (Luc), generando, respectivamente, el clon Ctl-Luc#4, y los clones 199b-Luc-1 y 199b-Luc-3. Todos estos se evaluaron para determinar su expresión de bioluminiscencia cuando al incubarse con el sustrato enzimático, la luciferina. A) Emisión de luz de diluciones en serie de las células indicadas en una microplaca. La señal de bioluminiscencia se adquirió mediante un sistema de obtención de imágenes IVIS 200 (Xenogen Corp. Alameda, CA). B) Correlación entre el número de células y la emisión de fotones. Los clones 199b-Luc1 y Ctl-Luc#4 se usaron para los estudios *in vivo*, con los datos mostrados como medias \pm DE a partir de dos experimentos independientes. C) Datos representativos de la expresión de miR-199b-5p en los clones de luciferasa, con respecto al clon de luciferasa que porta el vector vacío. D) Análisis de inmunotransferencia representativo que muestra la expresión disminuida de HES1 en los clones 199b-Luc, en comparación con el clon de vector vacío. E, F) Tinción con hematoxilina y eosina de xenoinjertos obtenidos a partir del ratón n.º 4: el lado inyectado con control muestra el xenoinjerto que infiltra el tejido muscular, mientras que el lado inyectado con 199b no. G, H) La nestina es un marcador de neuroblastos, y su expresión se correlaciona con un menor estado diferenciado: el xenoinjerto del lado inyectado con 199b del ratón n.º 4 muestra una disminución en la positividad de la Nestina. La tinción de Nestina se realizó mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal (Abcam). Ampliación, 100X. I) Niveles de expresión génica representativos del transgén miR-199b-5p en el explante tumoral del ratón n.º 5. Se perdió la sobreexpresión de miR-199b-5p. L, M, N) Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-HES1, anti-Ki67, anti-Gabra6, anti-Nestina, anti-Math3 y tinción con hematoxilina de los xenoinjertos del cerebelo de ratones Adv5-Mock y Adv5-199b. Se observa una expresión significativa de las proteínas Hes1, Ki67, Nestina y Math3 en el tejido tumoral del cerebelo de Adv5-Mock, mientras que se observa una expresión muy baja de Hes1, Ki67, Nestina y Math3 en las células tumorales Adv5-199b en el cerebelo. Apenas se observan diferencias de expresión de Gabra6 entre el tejido tumoral del cerebelo de Adv5-Mock y ratones Adv5-199b. Izquierda: ampliación, 25X; Derecha: ampliación, 100X.

Figura 13. La sobreexpresión de miR199b endógena tras el tratamiento con DAPT induce la regulación en descenso de los genes implicados en las células madre embrionarias y células madre de cáncer en la línea celular Daoy.

A) Datos representativos de un experimento en el curso del tiempo del tratamiento con DAPT de líneas celulares Daoy (6 h, 12 h, 24 h) con medios complementados y reemplazados cada 4 h, y pliegue de expresión de miR199b determinado usando detección cuantitativa en tiempo real, con respecto al Tiempo 0. B) Transferencia Western representativa que muestra la regulación descendente de HES1 después de 12 h de inducción de DAPT en la línea celular Daoy. C) Niveles de expresión génica relativos de CD133, c-Myc Oct4, KFL5, Nanog, TCF7L1, HMGA1, HMGB3, ZIC1, MYBL2, TEAD4, ILF3 en la línea celular Daoy con y sin tratamiento con DAPT durante 12 h. D) Expresión génica relativa de PDGFR-A, PDGFR-B y SPARC en la línea celular Daoy con y sin tratamiento con DAPT durante 12 h. Los cebadores usados y sus valores DDct de expresión relativa usando la detección cuantitativa de ADNc en tiempo real, se enumeran en la Tabla complementaria S3.

Figura 14. Mir-199-b-5p interfiere con el potencial de injerto de células Daoy inyectadas en cerebelo de ratón.

A) Análisis de bioluminiscencia *in vivo* usando IVIS 3D de ratón 199b-Luc1 xenoinjertado con línea celular Daoy Luc1 que sobreexpresa miR-199b mediante análisis de clones estables. (véase el ratón n.º 3, véanse datos adicionales en la Figura 4F, texto principal). El ratón se escaneó una vez por semana durante un total de 8 semanas. B) Las mediciones de BLI (fotón/s/cm²) de ratones portadores de células infectadas con ADV5-199b muestran reducciones a la semana 8. C) Imágenes tomadas por IVIS Spectrum a 560 nm y 660 nm para generar la topografía del sujeto. Los ratones xenoinjertados con Ctl-Luc-4 Adv5-Mock se mostraron en un eje 3D (x, y, z), con la extensión de la carga tumoral mostrada en comparación con un atlas de ratón digital que permitió la visualización del esqueleto tridimensional y los órganos en la reconstrucción tridimensional, usando el software Living Images. D) Como se ha descrito anteriormente, se realizan análisis de ratones xenoinjertados con Ctl-luc Adv5 199b. El vídeo de las imágenes tridimensionales se adjunta como archivos separados.

Figura 15 Mapa del vector adenovirico Adv5-CMV -Kpnl-NotI pA de 6217 pb con la secuencia SEQ ID NO:1.

Figura 16 Secuencia del vector Adv5-CMV-Kpnl-NotI pA 6217 pb (SEQ ID NO:2).

Figura 17: A) Ensayo de proliferación (MTS) de la línea celular de MB humano Daoy en 0, 24, 48 y 72 h después del tratamiento con SNALP de control (Daoy SNALP CTR) y con SNALP miR 199b-5p (Daoy SNALP 199b); B) Expresión de miR 199b-5p por PCR en tiempo real en la línea celular de MB humano Daoy después de 72 h del tratamiento con SNALP de control (Daoy SNALP CTR) y con el SNALP miR 199b-5p (Daoy SNALP 199b); C) Ensayo de apoptosis con Anexina V en la línea celular de MB humano Daoy después de 72 h del tratamiento con el SNALP de control (Daoy SNALP CTR) y con el SNALP miR 199b-5p (Daoy SNALP 199b); D) Expresión de Hes1 por transferencia western en la línea celular de MB humano Daoy después de 72 h del tratamiento con SNALP de control (Daoy SNALP CTR) y con SNALP miR 199b-5p (Daoy SNALP 199b).

Figura 18: A) Ensayo de proliferación (MTS) en la línea celular de carcinoma de colon humano 0, 24,48 y 72 h después del tratamiento con el SNALP de control (HT29 SNALP CTR) y con el SNALP miR 199b-5p (HT29 SNALP 199b); en el lado del análisis de transferencia Western de Hes1 después del tratamiento con el SNALP de control (HT29 SNALP CTR) y con el SNALP miR 199b-5p (HT29 SNALP 199b); B) Ensayo de proliferación (MTS) en el carcinoma de mama humano MDA-231T a 0, 24, 48 y 72 h después del tratamiento con SNALP de control (MDA-231T SNALP CTR) y con el SNALP miR 199b-5p (MDA-231T SNALP 199b). En el lado del análisis de transferencia Western de Hes1 después del tratamiento con el control SNALP y con el SNALP miR 199b-5p

Figura 19: **A)** Ensayo de proliferación (MTS) en la línea celular de carcinoma de colon humano 0, 24, 48 y 72 h después del tratamiento con el SNALP de control (4T1 SNALP CTR) y con el SNALP miR 199b-5p (4T1 SNALP 199b); **B)** Expresión del miR 199b-5p por PCR en tiempo real en la línea celular de carcinoma de mama murino 4T1 después del tratamiento con el SNALP de control (4T1 SNALP CTR) y con el SNALP miR 199b-5p (4T1 SNALP 199b); **C)** Ensayo de la apoptosis con Anexina V en la línea celular de carcinoma de mama murino 4T1 después de 72 h del tratamiento con el SNALP de control (4T1 SNALP CTR) y con el SNALP miR 199b-5p (4T1 SNALP 199b); **D)** Análisis de transferencia Western de Hes1 después del tratamiento con el SNALP de control y con el SNALP miR 199b-5p.

Figura 20: A) Correlación de inversión de la expresión de miR 199b-5p y el gen HMGA1 ($p = 0,046$) por PCR en tiempo real en 28 tejidos de carcinoma de mama mediante la prueba de Pearson. B) Expresión de miR 199b-5p y de los genes c-myc y CD133 en 28 tejidos de carcinoma de mama por PCR en tiempo real.

Figura 21: A) Correlación de inversión de la expresión de miR 199b-5p y el gen HMGA1 ($p = 0,08$) por PCR en tiempo real en 15 tejidos de carcinoma de colon mediante la prueba de Pearson. **B)** Expresión de miR 199b-5p y de los genes c-myc y CD133 en 15 tejidos de carcinoma de colon por PCR en tiempo real.

Ejemplo 1: Estudio de la función del miRNA 199b-5p en el cáncer

MATERIAL Y MÉTODOS

Divulgación ética

[0022] Todos los animales se trataron conforme a las guías nacionales e internacionales. La aprobación ética se obtuvo de la "Istituzioni per la Cura degli Animali e comitato etico CEINGE" - Università degli Studi di Napoli Federico II, Protocolo n.º 13 - 08/01/2007, y por Ministero della Salute Italiano, Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria DL 116/92, confirmando que todos los experimentos son acordes a un bajo nivel.

Análisis de citometría de flujo.

[0023] El análisis de citometría de flujo de las fracciones de estadio S y la cinética del ciclo celular se realizaron usando un FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) usando el software CELL Quest versión 3.3. Los estudios de CD133 se realizaron usando el mismo instrumento, con anticuerpos de Miltenyi Biotec (Auburn, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se bloquearon en el reactivo bloqueante del receptor Fc y se incubaron con un anticuerpo anti-CD133/1 (AC133) -flicoeritrina (Miltenyi Biotec), durante 10 minutos en la oscuridad a 4 °C. A continuación, las células se lavaron y se suspendieron de nuevo en PBS. Las células que expresan niveles más altos de CD133 que los controles de inmunoglobulina G (IgG) se consideraron positivas. Para los análisis de las poblaciones laterales, las células (106/ml) se incubaron con Hoechst 33342 (5 µmol/l; Sigma) durante 90 min a 37 °C en EMEM que contenía FBS al 2 %. Para asegurar la identificación correcta de las células de población laterales, las células se incubaron como anteriormente con la adición de verapamilo 50 µM (Sigma).

Obtención de imágenes in vivo a través de clones de luciferasa Daoy estables

[0024] Se generaron clones de células Daoy estables transfectando un vector de expresión de luciferasa (el gen

luciferasa de luciérnaga clonado en el vector plentiV5 Invitrogen) en el clon estable 199bSC1 o en el clon de vector vacío de control. Después se mezclaron 100.000 células de 199b-Luc1 y Ctl-Luc-4 viables con una solución 1:1 de PBS:matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA). Se anestesiaron ratones hembra atímicos de seis semanas de edad usando avertina (Sigma) como una solución al 3 % en alcohol terc-amílico (Fisher), a una dosis de 3 mg por 10 g de peso corporal. A los ratones se les inyectó s.c. un volumen total de 0,1 ml de suspensión de células PBS de matrigel, en cada costado. Los ratones se diagnosticaron por imágenes después de la implantación de las células, con el crecimiento tumoral controlado mediante adquisiciones semanales de bioluminiscencia (BLI) usando un sistema de imágenes IVIS 3D Illumina (Xenogen Corp. Alameda, CA). Para las adquisiciones, los ratones se anestesiaron con isoflurano por i.p., se les inyectaron 100 µl de D-luciferina (15 mg/ml de stock) por 10 g de peso corporal, y se formaron imágenes durante 30 s, 10 min después de la inyección de luciferina; se hicieron cuatro adquisiciones por ratón (ventral, dorsal y cada costado). Para cuantificar la bioluminiscencia, los flujos integrados de fotones (fotones por s) dentro de cada área de interés se determinaron usando el paquete de software Living Images 3.0 (Xenogen-Caliper). Los datos de emisión desde el inicio del crecimiento del tumor se recogieron durante al menos 6 semanas, y luego se normalizaron con respecto a la bioluminiscencia en el día de la inyección. Las mediciones de los calibradores de los tamaños tumorales se realizaron semanalmente, a lo largo de los ejes largo y corto, y las estimaciones de sus volúmenes se hicieron usando la fórmula: anchura² x longitud x 0,52.

Preparación de animales u obtención de imágenes por PET/CT

[0025] Los ratones se mantuvieron en una jaula ventilada (26 °C) durante 1 h antes de los estudios por imágenes. La anestesia se realizó con administración intraperitoneal de una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) (volumen de inyección, 100 µl/10 g). Se realizó un PET 1 h después de la administración de 3'-desoxi-3'-[18F]fluorotimidina ([18F] FLT), un marcador de proliferación tumoral (50 µl, 7,4 MBq, tiempo de exploración, 18 min), en una vena caudal lateral, usando un escáner PET para animales (GE Healthcare eXplore Vista, FWHM 1,6 mm). Se realizaron estudios de TC de alta resolución (GE Healthcare eXplore Locus, resolución espacial, 45 µm) a las 24 h del PET.

Análisis de datos

[0026] Se calcularon los valores de absorción estandarizados (SUV) máximos (SUV_{máx}) y medios (SUV) a partir de los estudios PET (SUV = actividad tisular (MBq/cc)/[dosis inyectada (MBq)/peso corporal (g)]). Las imágenes de PET/CT se procesaron posteriormente para obtener reconstrucciones multiplanares (MPR), proyecciones de máxima intensidad (MIP), renderizado de volumen tridimensional e imágenes de fusión, usando Osirix 3.3 (sistema operativo MAC OS 10.5). Se obtuvieron reconstrucciones tridimensionales adicionales utilizando MicroView (GE eXplore Locus).

[0027] Los volúmenes de lesión se calcularon a partir de datos de PET usando un software desarrollado internamente (basado en IDL, ITT Vis Inc), resumiendo todos los voxels espacialmente conectados con SUV > SUV_{máx} al 50 %. Los perfiles de lesión definidos con estos procedimientos se utilizaron para la comparación basada en ROI entre Adv5-Mock y Adv5-199b.

[0028] Los resultados presentados en la Figura 5 (texto principal) mostraron una masa tumoral a nivel de un amplio defecto craneal en el sitio del implante potencialmente debido a un alto nivel de tumorigénesis que ocurre dentro del cráneo y un alto nivel de degeneración cartilaginosa-ósea con la correspondiente captación de FLT en el análisis por PET. En este análisis PET-CT, se confirmó la presencia del desarrollo de un tumor agrandado en el cerebelo de los ratones control (Adv5-Mock#7), en comparación con los ratones xenoinjertados con células de sobreexpresión miR-199b-5p (Adv5-199p#5).

Cultivo celular estándar.

[0029] Se obtuvieron las líneas celulares Daoy humanas y de MB D283-MED de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se mantuvieron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM; Sigma) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS), 10 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina (Celbio Pero, Milán, Italia). Las células HEK-293 y SH-5YSY se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) complementado con FBS al 10 %, 10 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina.

Transfección de células Daoy y ensayos de luciferasa

[0030] Para determinar la actividad de miR-199b-5p sobre la represión de las construcciones fusionadas de luciferasa-3'UTR, la construcción pREYZO-miR-199b-5p y la construcción diana pRL-CMV-3'UTR se co-transfectaron en células HEK293 en una relación de 10:1, usando el reactivo Polyfect (Qiagen) junto con el vector básico pGL3, en ausencia y presencia de 2-OM (400 nM). Las actividades de luciferasa se analizaron usando un sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual (Promega, Madison, WI).

Tratamiento AZA

5 **[0031]** Se cultivaron cinco líneas celulares de MB (d283, Daoy, med8a, ons76, uw228) en DMEM complementado con FBS al 10 % y antibióticos. Tras alcanzar una confluencia del 85 %, el medio se marcó con 5-aza-desoxicitidina (AZA) (Sigma) a una concentración final de 5 μ M. Durante 72 horas, el medio se reemplazó diariamente con medio mejorado con AZA fresco. El ARN se extrajo utilizando un protocolo de fenol (TRIzol)-cloroformo estándar.

Clonación de vectores

10 **[0032]** Se clonó pre-miR-199b en un vector modificado con pcDNA3 (pREYZO) (D'angelo et al., 2004) usando sitios de restricción EcoRI-XhoI. Los sitios de unión a diana HES1 y GSK-3 β (3'UTR) se clonaron en tándem en la 3'UTR del vector pRL-citomegalovirus (CMV) (Promega, Madison, WI) aguas abajo de la región codificante de Renilla luciferasa (RL) en el sitio XbaI. La 3'UTR de HES1 (incluyendo el sitio de unión a 199b) se amplificó a partir
15 del ADN genómico con los siguientes cebadores: HES1_3'UTR como AAAATCTAGACAGTTCTGAAGACATAAAAAGCC y HES1_3'UTR como AAAATCTAGAAACGCAGTGTACCTTCC, y se clonó en el vector TK (Promega, Madison, WI) aguas abajo del gen de luciferasa de luciérnaga, en los sitios XbaI. Se obtuvo ADNc de longitud completa HES1 con un enfoque por RT-PCR estándar a partir de un ADNc de Daoy.

Mutagénesis dirigida a sitio

20 **[0033]** La mutagénesis de sitio dirigido del sitio de unión a miR-199b-5p en la 3'UTR de HES1 se generó de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit de mutagénesis de sitio dirigido QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA). Se utilizó el siguiente cebador para la mutagénesis (sólo se da la secuencia de sentido, y los nucleótidos mutados dentro de la secuencia de consenso están subrayados): HES1 3'UTR de sentido
25 AACAGGA~~ACTTGAATATTTGTAGAGAAGAGGACTTT~~

Ensayo de miRNA TaqMan**Reacciones de transcriptasa inversa**

30 **[0034]** Las reacciones de la transcriptasa inversa (RT) contenían 40 ng de muestra de ARN, cebador RT tallo- bucle 50 nM, 1 x tampón de RT (P/N: 4319981, Applied Biosystems), 0,25 mM cada uno de dNTP, 3,33 U/ml de MultiScribe RT (P/N: 4319983, Applied Biosystems) y 0,25 U/ml de inhibidor de RNasa (P/N: N8080119; Applied Biosystems). Las reacciones de 15 μ l se incubaron en un termociclador Applied Biosystems 9700 durante 30 min a 16 $^{\circ}$ C, 30 min a 42 $^{\circ}$ C, 5 min a 85 $^{\circ}$ C y luego se mantuvieron a 4 $^{\circ}$ C.

PCR en tiempo real

40 **[0035]** El análisis por PCR en tiempo real se realizó utilizando un protocolo de kit de PCR TaqMan estándar en un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems 7900HT. La mezcla de PCR de 20 μ l incluía 2 μ l de producto de RT, 10 μ l de mezcla maestra de PCR Universal TaqMan (Applied Biosystems), sonda TaqMan 0,2 mM. Las reacciones se incubaron en una placa de 96 pocillos a 95 $^{\circ}$ C durante 10 min, seguido por 60 ciclos de 95 $^{\circ}$ C durante 15 s y 60 $^{\circ}$ C durante 1 min.

Aislamiento del ARN, preparación de ADNc y PCR cuantitativa en tiempo real

45 **[0036]** Se extrajo ARN total de las líneas celulares utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen). La síntesis de ADNc de ARN total (4 μ g) se realizó utilizando un kit Super Script II First Strand (Invitrogen). El análisis por PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando protocolos estándar con un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT de Applied Biosystems. Para calcular la expresión génica relativa del precursor miR-199b-5p, las cantidades relativas de cada pre-miRNA se normalizaron con respecto a miRNA de U6; los otros genes se normalizaron utilizando el gen β -actina. Los cebadores de PCR en tiempo real para cada gen se diseñaron utilizando el software Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems). Las secuencias de cebadores están disponibles bajo petición.

50 **[0037]** El ID de Unigene y la secuenciación de los cebadores para el análisis del gen implicado en la biología de células madre de cáncer con valores 2^{-DCt} se muestran en la tabla 1.

ES 2 621 824 T3

Nombre del gen	ID Unigene	Tabla 1		Daoy + DMSO	Daoy + DAPT 12 h
		Cebador de sentido	Cebador antisentido		
c-Myc	Hs.2024 53	ATGAGGAGACACCG CCCAC (SEQ ID NO:24)	AACATCGATTCTT CCTCATCTTCTT(SE Q ID NO:25)	0,0987097	0,0542671
Nanog	Hs.6613 60	GCAAATGTCTTCTG CTGAGATGC(SEQ ID NO:26)	GCTGTCCTGAATAA GCAGATCCAT(SEQ ID NO:27)	0,0001832	0,0004488
CD 133	Hs.6147 34	CTATGTGGTACAGC CGCGTG(SEQ ID NO:22)	TAATCAATTTTGGGA TTCATATGCCTTC(SEQ ID NO:23)	0,0020653	0,0012368
Oct4	Hs.2491 84	ACTGCAGCAGATCA GCCACA(SEQ ID NO:28)	TGGCGCCGGTTAC AGAAC(SEQ ID NO:29)	0,0001200	0,0007941
PDGFR -B	Hs.5090 67	AGGTTGCTGACGAG GGCC(SEQ ID NO:84)	GGTGTGACTTCAT TCAGGGTG(SEQ ID NO:85)	0,0006059	0,0000606
PDGFR -A	Hs.7461 5	TCAAGGCAGAAATA GGCAGCA(SEQ ID NO:86)	TGGACGTCGATCA GGTCCA (SEQ ID NO:87)	0,0000003	0,0000015
SPARC	Hs.7085 58	TTGCCTGGACTCTG AGCTGA(SEQ ID NO:88)	GGGTGACCAGGAC GTTCTTG(SEQ ID NO:89)	0,3431687	0,0797725

ES 2 621 824 T3

ILF3	Hs.4658 85	CCGACACGCCAAGT GGTT(SEQ ID NO:90)	ACACAAGACTTCA GCCCCGTTG(SEQ ID NO:91)	0,0352218	0,0425171
MYBL2	Hs.1797 18	AGCAAGTGCAAGGT CAAATGG(SEQ ID NO:92)	GGCCCTCAGCTGC TCGT(SEQ ID NO:93)	0,0130289	0,0039321
TEAD4	Hs.9486 5	TCGGACGAGGAGG GCAAGATG(SEQ ID NO:94)	GATGTAGCGGGCA ATCAGCT(SEQ ID NO:95)	0,0117936	0,0051764
TCF7L1	Hs.5162 97	CCGCGGGACTATTT CGC(SEQ ID NO:30)	AAAGAACGCGCTG TCCTGAG(SEQ ID NO:31)	0,0006742	0,0001026
HMGA1	Hs.5188 05	AAAAACAAGGGTGC TGCCAA(SEQ ID NO:36)	CCTTCCTGGAGTT GTGGTGGT(SEQ ID NO:37)	0,7977002	0,0048793
ZIC1	Hs.5985 90	CAGTTCGCTGCGCA AAC(A(SEQ ID NO:32)	GAGCCCTGCGAGG AGGAT(SEQ ID NO:33)	0,0283592	0,0002784
HMGB3	Hs.1911 4			0,1946868	0,0055773

		TTTTCCAAGAAGTG	TTTCTCTTTCCCGG		
		CTCTGAGAGG(SEQ	ACATCG(SEQ ID		
		ID NO:38)	NO:39)		
		GCATCCACTACTGC	TGAGAAGACTTGG		
KLF5	Hs.5082 34	GATTACCC(SEQ ID	TATAAACTTTTGTG	0,0027895	0,0236774
		NO:34)	C(SEQ ID NO:35)		

Transferencia Western

5 [0038] Se cargaron treinta µg de lisados citosólicos o nucleares en geles de poliacrilamida al 12 %, y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, BioRad, Milán, Italia). Las membranas se incubaron entonces con *anti-HES1* (regalo del Dr. Tetsuo Sudo TORAY Industries, Tebiro Kamakura, Japón), un anticuerpo policlonal de conejo (1:500), un anticuerpo monoclonal anti-GSK3-β (B&D Bioscience) (1:2500), un anticuerpo policlonal de conejo anti-c-Myc (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos), un anticuerpo anti-GABRA6 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Estados Unidos) (1:200), un anticuerpo anti-MATH3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Estados Unidos) (1:200) y un anticuerpo policlonal de conejo anti-ciclina D1 (1:200) (señalización celular). Se utilizó un anticuerpo anti-β-actina (1:1.000) (Sigma) como control para la carga equivalente de lisados citosólicos y un anticuerpo anti-β-laminina policlonal (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) para la carga equivalente de lisados nucleares.

15 **Ensayos soft-agar**

[0039] Se sembraron células Daoy y el clon 199b estable en 1 ml de EMEM complementado con FBS al 2 %, que contenía agarosa al 0,3 %. Los cultivos se mantuvieron durante dos semanas y se refrescaron con EMEM complementado con FBS al 2 % dos veces por semana. Las colonias de más de 100 µm de diámetro se contaron bajo un microscopio compuesto DC500 Leica (Nussloch, Alemania).

Ensayo de proliferación MTS

25 [0040] La proliferación celular se determinó usando el kit de ensayo de proliferación celular no radioactivo CellTiter96 AQueous (Promega Madison, WI). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^3 células/pocillo en EMEM con o sin FBS. Después de 0, 24, 48 y 72 h, se añadieron MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio] y PMS (metosulfato de fenazina) a cada pocillo y después de 4 horas se midió la absorbancia de cada pocillo a 490 nm (DO₄₉₀) usando un contador multietiqueta Victor³ (Perkin Elmer). Cada condición se realizó con cinco pocillos y cada experimento se repitió dos veces.

30 **Inmunohistoquímica**

35 [0041] El desenmascaramiento se realizó en tampón citrato 10 mM, pH 6, a 97 °C durante 45 min. El bloqueo se realizó con un diluyente de anticuerpo con componentes reductores de fondo (Dako Cytomation) durante 30 minutos a temperatura ambiente; se usaron los anticuerpos policlonales anti-HES1 (1:1000), anti-Nestina (1:1000), anti-GABRA6 (1:100), anti-MATH3 (1:100) durante una noche a 4 °C. Las señales se revelaron usando el kit LSAB DAKO, durante 15 min (Biotina), y un kit LSAB DAKO, durante 15 min (Estreptavidina), a temperatura ambiente.

40 [0042] DAB era de DakoCytomation, y los portamuestras se montaron y se examinaron bajo un microscopio compuesto DC500 Leica (Nussloch, Alemania).

Hibridación in situ de ácido nucleico bloqueado

45 [0043] Se fijaron portaobjetos secos de matrices cerebrales de embriones murinos o tisulares humanos múltiples en paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron dos veces durante 3 minutos en 1 x PBS a temperatura ambiente. Durante las etapas de lavado, la solución de acetilación se preparó de nuevo, que contenía: Trietanolamina al 0,01 % y anhídrido acético 0,0025 mM en agua de dietilenoipirocarbonato (DEPC).

Los portaobjetos se pusieron luego en un vaso de precipitados de solución de acetilación y se agitaron suavemente durante 10 min. Los portaobjetos se sometieron entonces a tratamiento con proteinasa K a 5 µg/ml en agua tratada con DEPC, seguido de tres lavados durante 3 min en 1 x PBS a temperatura ambiente, y se hibridaron previamente durante 6 h a temperatura ambiente con solución de hibridación. La hibridación fue con 150 µl de hibridación desnaturalizante, con 1 pM de la sonda marcada con DIG de ácido nucleico bloqueada (Exiqon, miRCURY). La hibridación se realizó a 60 °C durante una noche. Los portaobjetos se remojaron en 5 x SSC precalentado a 60 °C y los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente; los portaobjetos se incubaron a continuación en 0,2 x SSC a 60 °C durante 1 h, después se incubaron en Tris 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M a temperatura ambiente durante 10 min. La solución sobrante se eliminó y los portaobjetos se colocaron en una cámara humidificada; se pusieron 500 µl de solución de bloqueo (FCS al 1 % en Tris 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M) sobre los portaobjetos para una incubación de 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-DIG-fosfatasa alcalina se diluyó 1:2.000 en solución de bloqueo y se incubó a 4 °C durante una noche. Los portaobjetos se lavaron tres veces en Tris 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M y luego se equilibraron en Tris 0,1 M, pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl 50 mM. Los portaobjetos se tiñeron con BCIP/NTB (Sigma), se deshidrataron y se montaron; las imágenes se adquieren bajo un microscopio compuesto DC500 Leica (Nussloch, Alemania).

Tratamiento DAPT de la línea celular Daoy

[0044] La línea celular Daoy humana se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se mantuvo en EMEM (Sigma Aldrich, Milán, Italia) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS) (Celbio Pero, Milán, Italia), 10 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina (Celbio Pero, Milán, Italia). Las células HEK-293 y SH-5YSY se mantuvieron en DMEM (Sigma) complementado con FBS al 10 % (Celbio), 10 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina (Celbio).

[0045] Se realizó un tratamiento con éster *t*-butilico de *N*-[*N*-(3,5-difluorofenacetil)-1-alanil]-*S*-fenilglicina (DAPT (Sigma-Aldrich) de las células Daoy como se indica a continuación: las células se pusieron y se dejaron crecer durante una noche en medio que contenía FBS al 10 %. A la mañana siguiente, el medio se reemplazó con medio que contenía DAPT 10 µM y se reemplazó cada 4 h con este medio. Los ensayos de expresión se realizaron después de 0, 6, 12, 24 h de tratamiento de MiR199b, usando experimentos de control que incluían el volumen correspondiente de DMSO como vehículo.

Ensayo de motilidad celular in vitro

[0046] Se usaron línea de células DAOY de control y el clon estable DAOY-199bSC1 en los ensayos de "motilidad celular". Los ensayos de migración celular se realizaron con transpocillos de un tamaño de poro de 8 µm (Costar). Las células se suspendieron mediante tripsinización, se lavaron y se suspendieron de nuevo en 100 µl de DMEM libre de suero que contenía BSA al 0,1 % (5 x 10⁴ células) y se colocaron en la cámara superior de los transpocillos. La cámara inferior se llenó con 600 µl de DMEM libre de suero complementado con FBS al 0,5, como el quimioatrayente. Las células se dejaron migrar durante 1 h a 37 °C. Las células que migraron hacia el lado inferior de la membrana de policarbonato se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % y se tiñeron con una solución de hematoxilina (Sigma). Las células se contaron, y el análisis se realizó en tres transpocillos para cada condición, y cada experimento se repitió dos veces.

Muestras de pacientes

[0047] Se recogieron un total de 61 casos de MB de tres centros diferentes: 12 muestras de MB quirúrgico procedían del Department of Neurosurgery, Santobono Hospital, Nápoles, Italia; 18 eran del Institute Curie, París, Francia; y 31 eran de The Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá. Las características de los pacientes se dan en la Tabla 2. El consentimiento informado se obtuvo antes del análisis de las muestras tumorales. Todos los especímenes se obtuvieron en el momento del diagnóstico, antes de la radiación o quimioterapia, y 29 fueron sometidos a revisión histopatológica de acuerdo con los criterios de la OMS [14], la información de estado M estaba disponible para todos los pacientes. Los tejidos humanos de control se obtuvieron del NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders de la University of Maryland, Baltimore, Maryland. El ARN total se extrajo usando el reactivo Trizol (Invitrogen), como se ha descrito anteriormente para las líneas celulares, y se analizó para los niveles de expresión miR-199b-5p mediante el ensayo de MicroRNA TaqMan. Los niveles de expresión de miR-199b-5p se dividieron en dos grupos (bajo y alto), de acuerdo con la media, y se compararon entre los grupos metastásicos y no metastásicos usando la prueba de ji-cuadrado de Pearson. Los análisis de supervivencia se obtuvieron a través del software SPSS, utilizando una prueba de rango logarítmico para determinar la significancia. La significancia estadística se estableció a un valor de P de 0,05.

Tabla 2

Pacientes	Edad en el diagnóstico (meses)	Seguimiento (meses)	*Último estado	Estadio M (Cambio)	Histología	Expresión relativa Mir-199b-5p (U6) 2 ⁻ ΔCt
MB102	108	32,8	muerte	M3	clásica	0,0009956 1
MB108	96	19,5	CR1	M0	desmoplásica	0,0900122 7
MB106	50	4	muerte	M0	clásica	0,0106137 42
MB111	9	72,2	CR1	M0	desmoplásica	0,1201385 83
MB114	21	74,6	CR1	M0	desmoplásica	0,0003837 71
MB119	93	32,8	CR1	M1	clásica	0,003199194
MB120	108	27,5	CR1	M0	clásica	0,218701701
MB123	37	13,6	muerte	M3	clásica	0,006959284
MB126	13	74,8	CR2	M0	clásica	0,067296233
MB128	78	31,7	CR1	M0	desmoplásica	0,076875702
MB133	158	87	CR1	M0	clásica	0,025786457
MB137	93	84	CR1	M0	clásica	0,019919437
MB79	36	14,1	muerte		medulo-mioblastoma	0,194622694
MB80	96	43,1	CR1	M2	desmoplásica	0,000152879
MB81a	109	14	muerte	M0	Células grandes	0,019211033
MB95	41	32,1	CR1	M0	clásica	0,002433079
MB96	44	42	muerte	M0	clásica	0,004037267
MB99	99	21,9	muerte	M0	clásica	0,015258058
N1	69	49	CR1	M2	clásica	0,005729706
N2	90	20	CR1	M0	clásica	0,206256346
N3	26	34	CR1	M0	desmoplásica	1,770829272
N4	124	14	CR1	M0	clásica	0,014508728
N5	64	36	PR	M0	clásica	0,386116248
N6	35	1	muerte	M3	Células grandes	0,007290413
N7	76	22	CR1	M0	clásica	0,009490309
N8	169	26	CR1	M0	clásica	0,066566636
N9	128	10	CR1	M0	clásica	0,379446328
N10	29	20	PD	M0	clásica	0,032431549

ES 2 621 824 T3

N11	140	34	CR1	M0	clásica	0,097916916
N12	34	19	PD	M0	desmoplásica	0,034231549
MDT-MB-1	25	6	muerte	M+(1-2-3)		1,574119241
MDT-MB-2				M+(1-2-3)		0,012369684
MDT-MB-3				M0		0,408535751
MDT-MB-4				M0		0,014345797
MDT-MB-5				M+(1-2-3)		0,117424185
MDT-MB-6	27	33	muerte	M0	desmoplásica	1,924140125
MDT-MB-7	88	14	muerte	M0	anaplásica	0,369604567
MDT-MB-8	124	39	vivo	M0	anaplásica	0,499210685
MDT-MB-9	39	95	vivo	M0		0,085790892
MDT-MB-38	60	78	vivo	M0		0,019155739
MDT-MB-46				M0		1,875853287
MDT-MB-50				M+(1-2-3)		0,043612817
MDT-MB-71				M0		0,07458206
MDT-MB-100	32	34	vivo	M0		0,645850534
MDT-MB-102	26	33	vivo	M+(1-2-3)	anaplásica	0,020193158
MDT-MB-103	65	33	vivo	M0		0,130267521
MDT-MB-118	109	32	vivo	M+(1-2-3)	anaplásica	1,776616235
MDT-MB-124				M0		0,902823686
MDT-MB-131				M+(1-2-3)		0,277894072
MDT-MB-154				M+(1-2-3)		0,03848591
MDT-MB-174				M+(1-2-3)		0,016130305
MDT-MB-175				M0		0,821566771
MDT-MB-177				M+(1-2-3)		0,004737906

ES 2 621 824 T3

MDT-MB-193				M+(1-2-3)		0,142617576
MDT-MB-194				M+(1-2-3)		0,484220261
MDT-MB-201				M0		0,053878318
MDT-MB-207	61	110	vivo	M0		0,025498266
MDT-MB-220	69	20	vivo	M0		1,119673662
MDT-MB-222	72	20	vivo	M+(1-2-3)		0,050742316
MDT-MB-223	131	20	vivo	M0		0,374030612
MDT-MB-224	167	13	muerte	M0	anaplásica	1,02682E-10
2M2	10	26	CR1	M0	Clásica	0,007714069
2M16	9	72	vivo	M0	Clásica	0,001090312
4M1	1	3	muerte	M0	Clásica	0,022951675
4M10	8	8	vivo	M1	Clásica	0,000362543
4M11	9	6	0	M3	Clásica	0,012582419
4M12	5	58	0	M0	Clásica	0,003358695
4M13	16	14	0	M0	Clásica	0,280568718
4M15	9	14	CR1	M1	Clásica	0,066604933
4M16	9	18	vivo	M0	Clásica	0,004022173
4M17	8	24	vivo	M3	Clásica	0,182681185
4M18	14	22	vivo	M0	Células grandes	0,245240791
4M19	10	62	vivo	M3	Clásica	0,072460116
4M2	6	12	vivo	M0	Clásica	0,055299918
4M20	5	26	vivo	M1	Clásica	0,001948092
4M21	2	31	vivo	M3	Células grandes	0,043166742
4M22	4	27	vivo	M3	clásica	0,001217318
4M23	11	17	Muerte debido a la enfermedad	M2	clásica	0,034755336
4M26	10	12	vivo	M0	clásica	0,066137644

ES 2 621 824 T3

4M27	8	36	vivo	M2	clásica	0,052555486
4M28	16	49	CR1	M0	clásica	0,017134081
4M3	9	24	vivo	M3	clásica	0,173909476
4M30	6	14	vivo	M0	clásica	0,000593161
4M31	6	50	vivo	M0	clásica	0,199915108
4M32	3	48	vivo	M0	clásica	0,203934051
4M33	1	36	vivo	M0	clásica	0,080160885
4M35	6	36	vivo	M0	clásica	0,020431867
4M36	2	36	vivo	M3	clásica	0,102537563
4M37	3	48	vivo	M1	clásica	0,01621208
4M38	8	15	Muerte debido a la enfermedad	M2	clásica	0,000346883
4M39	7	18	vivo	M0	clásica	0,014986991
4M4	7	60	vivo	M0	clásica	0,161266704
4M40	10	36	vivo	M0	clásica	0,001348005
4M41	12	36	vivo	M0	clásica	0,057124436
4M42	6	18	vivo	M0	clásica	0,032851388
4M43	14	16	vivo	M3	clásica	0,033246248
4M44	8	22	vivo	M3	Células grandes	0,228057449
4M48	11	12	vivo	M3	clásica	0,014309066
4M49	6	20	CR1	M3	clásica	0,007560172
4M5	7	18	vivo	M0	clásica	0,003118728
4M50	6	41	vivo	M0	clásica	0,131638757
4M55	12	36	vivo	M0	clásica	0,011346624
4M58	3	15	Muerte debido a la enfermedad	M3	Células grandes	0,003100982
4M6	10	26	vivo	M0	clásica	0,017322564
4M7	4	20	vivo	M1	clásica	0,008736515
4M8	8	12	vivo	M0	clásica	1,065853534
4M9	8	26	vivo	M0	clásica	0,007555274

Continuación tabla 2

Código de los pacientes	Edad al morir (meses)	Mir-199-5p U6 2 [^] -DCt
Grupo 1-2 años		
1210	0,2	0,028323341
1157	0,02	0,091384778
1102	0,39	0,010811309
779	0,005	0,009558291
814	1,41	0,031308608
Grupo 13-16 años		
1297	15,81	0,001938772
1158	16,63	0,001053237
1065	15,29	0,002201934
1024	14,6	0,000768088
931	13,12	0,003939267
142	16,73	0,000206487

Construcción de adenovirus

5 [0048] La secuencia de miR199b era 5'-XhoI, 3'-HindIII dirigida clonada en el vector lanzadera VQ Ad5CMV K-NpA, suministrado por ViraQuest Inc., Innovative Adenovirus Technologies and Reagents, que proporcionó su recombinación y la construcción de adenovirus 199b (véase la figura 16 que mostraba la secuencia vectorial SEQ ID NO: 2 y la figura 15 que mostraba el vector con la secuencia SEQ ID NO: 1). También suministraron el virus E3 Luciferasa de la estructura de control, generado a partir de un plásmido VQ Ad5CMVeGFP.

Infección adenovírica

15 [0049] La infección con virus recombinantes se realizó exponiendo las células a adenovirus en 500 µl de medio de cultivo celular completo durante 1 h, seguido de la adición de otro medio. Se usó la expresión de GFP por el adenovirus (AdV MOCK y AdV 199b) como un control al determinar la eficiencia de transfección.

Heterotrasplante en el ventrículo derecho del cerebelo de ratones SCID

20 [0050] Para establecer modelos de xenoinjerto intracerebelar, se anestesiaron ratones SCID de 6 a 8 semanas de edad con Tribromoetanol (Avertin®) (50 mg/kg); después de esto, se realizó una pequeña incisión cutánea (1 mm) y se creó un orificio de trépano (0,7 mm de diámetro) con un taladro microquirúrgico (Fine Science Tools, Foster City, CA). Se suspendieron células Daoy Luc infectadas con adenovirus mock, adenovirus 199b y clones estables 199b LUC1 (105) en 5 µl de PBS y se inyectaron lentamente a través del orificio de trépano en el hemisferio cerebelar derecho (coordenadas estereotácticas de bregma anteroposterior 5,5 mm; lateral derecho 2,1 mm; dorsoventral 5,0 mm) usando una aguja de jeringa Hamilton Gastight 1701 de calibre 26, 10-AL que se insertó perpendicular a la superficie craneal. Los animales se controlaron semanalmente por bioluminiscencia para evaluar el crecimiento tumoral durante 8 semanas.

Adquisición tridimensional

35 [0051] Espectro IVIS: este sistema adquiere una imagen fotográfica y una imagen luminosa estructurada, y dos o más imágenes bioluminiscentes a diferentes longitudes de onda (560 a 660 nm), y genera la topografía superficial (malla) del sujeto. Al modificar los parámetros específicos del algoritmo DLIT modificables por el usuario (por ejemplo, longitudes de onda de análisis, espectro de la fuente y propiedades tisulares), podemos reconstruir la posición, la geometría y la intensidad de las fuentes luminiscentes en el sujeto. El software Living Image®

proporciona atlas digitales de ratón que permiten la visualización de un esqueleto tridimensional y órganos en la reconstrucción tridimensional.

PET y SPECT-CT de los animales

[0052] A continuación, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2,5 % y se mantuvieron bajo anestesia con isoflurano al 1 % a lo largo de todos los procedimientos de obtención de imágenes. La obtención de imágenes por PET con [¹⁸F]FDG y [¹⁸F]Fluoruro se utilizó para examinar los cambios metabólicos y esqueléticos inducidos por células tumorales, respectivamente. Las imágenes se adquirieron con tres posiciones de cama (10 min por posición de cama, durante un total de 30 min) y una resolución axial de 1,2 mm, utilizando un sistema PET-CT para animales pequeño Explorer-Vista (GE Healthcare).

RESULTADOS

Hsa-miR-199b-5p silencia la expresión de HES1 a través de la unión a 3'UTR.

[0053] Este análisis *in silico* de la base de datos de dianas mirBase [27] se dirigió a la identificación de miRNA potencialmente dirigidos a HES1, un efector de la ruta Notch, un mecanismo fundamental en la regulación de la proliferación de células de MB. MiR-199b-5p y miR-199a-5p fueron los mejores miRNA de puntuación, y se predijo que se unen a la 3'UTR de bHLH HES1 humano. Se centró el enfoque en miR-199b-5p debido a su capacidad para disminuir la expresión de HES1 en la sobreexpresión transitoria, en comparación con miR-199a-5p (Figura 9A, B). MiR-199b-5p se pierde en los tumores de pulmón [28] y se ha correlacionado con una región genómica suprimido en el cáncer de vejiga [29]. MiR-199a* (también conocido como miR-199a-5p, y con una secuencia idéntica a miR-199b-5p) también se reduce en el carcinoma hepatocelular [30-32]. El análisis de la expresión de miR-199b-5p en dos líneas celulares de MB, tejido adulto humano y cerebelo de ratón, se muestra en las Figuras 9C, D y 10A, B.

[0054] Para determinar si HES1 es una diana de miR-199b-5p, se clonó la 3'UTR de HES1 aguas abajo de un vector del gen indicador de luciferasa; pre-miR-199b-5p también se clonó en un vector de expresión de mamífero. Las células HEK-293 se transfectaron entonces con la actividad de luciferasa relativa que mostraba mostrando que la co-transfección de miR-199b-5p disminuyó la actividad del gen indicador, indicando de este modo la unión con la 3'UTR y la desestabilización de la traducción productiva del ARNm de la luciferasa (Figura 9, 9E). Como controles, 3'UTR de HES1 mutado en el sitio de unión a miR-199b-5p no se vio afectada por miR-199b-5p (Figura 9, 9E), y cuando se co-transfectó un oligoribonucleótido 2-O'-metilo (2-OM) complementario al miR-199b-5p maduro, contrarrestó los efectos de la transfección de miR-199b-5p, restaurando la actividad indicadora (Figura 9, 9E). Se obtuvieron resultados similares en las células de MB Daoy (Figura 9, Figura 9F).

[0055] Para determinar el papel de miR-199b-5p en la biología de células de MB, la construcción de expresión de miR-199b-5p se transfectó en células Daoy, y se seleccionaron varios clones estables que sobreexpresaban miR-199b-5p. La sobreexpresión se confirmó por PCR en tiempo real (Figura 9, 9G). Tres clones demostraron niveles de proteína HES1 reducidos, uno de los cuales (199bSC1) no mostró HES1 detectable. Los clones 199bSC1 y 199bMC1 se seleccionaron para investigación adicional (Figura 9, 9H). Estos efectos de miR-199b-5p en la expresión de la proteína HES1 no se limitaron a los clones estables o las células Daoy, ya que las células D283MED transfectadas transitoriamente con la construcción de expresión para miR-199b-5p también mostraron niveles reducidos de HES1 (Figura 9, 9B).

[0056] Para reforzar estos hallazgos, el clon 199bSC1 se transfectó con 2-OM antisentido con respecto a miR-199b-5p y se usó como control negativo (Figura 9, 9I). Aquí, los niveles de HES1 niveles se restauraron, lo que sugiere que 2-OM bloquea la represión de HES1 por miR-199b-5p, proporcionando una mayor confirmación de que miR-199b-5p se dirige a HES1 directamente. Otras dianas potenciales de miR-199b-5p también se investigaron de esta manera (Figura 9, Figura 10C, D).

La sobreexpresión de miR-199b-5p reduce la proliferación celular y altera el potencial clonogénico de las líneas celulares de MB.

[0057] Los clones 199bSC1 y 199bMC1 tenían velocidades de proliferación reducidas en condiciones de cultivo estándar, al compararse con el clon de control. Por lo tanto, se buscaron potenciales alteraciones del ciclo celular en estos clones. El análisis FACS en el clon 199bSC1 mostró una disminución del 31 % en las fracciones en estadio S, y un aumento de las células en G0-G1 del 15 %, en comparación con el clon del vector vacío (Figura 1A). Esto sugirió que la salida del ciclo celular tiene un papel en la velocidad de proliferación reducida del clon 199bSC1 de células Daoy. Por el contrario, el clon 199bMC1 no mostró cambios significativos en su ciclo celular. Se cree que estos hallazgos se deben a una menor eficiencia general de 199bMC1 para reducir los niveles de proteína HES1. Estos fenotipos del ciclo celular se tradujeron en velocidades de proliferación disminuidas *in vitro*, según se evalúa mediante ensayos de proliferación *in vitro* comparando los clones 199bSC1 y 199bMC1 con un clon de vector vacío

y un transfectante transitorio para 2-OM diseñado contra miR-199b-5p (Figura 1B). Tanto el clon 199bMC1 como el clon 199bSC1 mostraron velocidades de proliferación notablemente reducidas. La transfección de este 2-OM antisentido indujo un aumento marcado en la proliferación del clon estable 199bSC1, de acuerdo con los niveles de expresión restaurados de HES1. Estos resultados sobre la proliferación de células Daoy se confirmaron también con las células D283 y ONS76 (Figura 10F). También se confirmaron los efectos de 2-OM específico de miR-199b en células Daoy de tipo silvestre, donde actúa potencialmente sobre el miR-199b endógeno (Figura 10G).

[0058] Los efectos de la inducción de miR-199b-5p se evaluaron en marcadores moleculares de proliferación y diferenciación mediante un enfoque en tiempo real. Como se ilustra en la Figura 1C, MAP2, que se expresa en su mayor parte en las neuronas maduras [33], se reguló por aumento en los clones estables 199bSC1 y 199bMC1. De forma similar, se ha indicado que las células Daoy expresan GFAP después de la diferenciación con el fenilbutirato [34], y en el clon estable 199bSC1, los niveles de GFAP se aumentaron. En general, la imagen de la expresión génica en esta línea celular estable que sobreexpresa miR-199b-5p es acorde con el fenotipo que se ha visto en el cerebro del ratón *Hes1*^{-/-} [23]. Entre los otros genes, GABRA6, un marcador de la diferenciación de células granulares cerebelosas, también se sobreexpresó significativamente en los clones estables (Figura 1C).

[0059] Una cascada afinada de factores de transcripción de bHLH positivos y negativos es fundamental para la neurogénesis, con genes tales como *MASH1*, *MATH3* y *NGN2* que inducen la neurogénesis, y los ratones mutantes de HES1 que muestran una regulación ascendente de estos bHLH de tipo activador [35]. Ambos clones estables miR-199b-5p mostraron aumentos en la expresión de bHLH pro-neural. De acuerdo con su reducción en la velocidad de proliferación, los marcadores de proliferación c-Myc y ciclina D1 se disminuyeron. De los dos clones analizados, 199bSC mostró el fenotipo más consistente; se explican estos resultados por el silenciamiento de HES1 más eficiente en este clon.

[0060] Dado que el clon 199bSC1 estable de miR-199b-5p mostró un fenotipo más fuerte y más consistente, se examinó después en un ensayo clonogénico estándar, para determinar si el crecimiento independiente del anclaje estaba afectado por miR-199b-5p. En este caso, hubo una reducción del 80 % en el potencial de formación de colonias, en comparación con el clon de vector vacío (Figura 1D). De acuerdo con esta reducción en la velocidad de proliferación, los marcadores de proliferación c-Myc y ciclina D1 se disminuyeron (Figura 1E). Se ha confirmado también a nivel de proteína que GABRA6 y MATH3 se regularon en aumento en el clon 199bSC1 (Figura 1 F); se sabe que éste último se reprime directamente por HES1 [35].

El MiR-199b-5p agota el compartimiento de población lateral en la línea celular Daoy y regula negativamente las poblaciones de células madre tumorales de MB.

[0061] La ruta Notch se ha unido a la fracción de las células tumorales de MB que albergan los marcadores de células madre precursoras [36], y HES1 tiene una función en la auto-renovación de las células progenitoras multipotentes [23]. Esta población lateral (SP) de las células tumorales tiene una función en el injerto de un tumor en modelos animales [37]. Por lo tanto, se examinó la influencia de miR-199b-5p en la población de células tumorales que excluyen el colorante Hoechst 33342, una estrategia para identificar estas células SP. Esto se determinó por citometría de flujo en la línea celular Daoy, cuya SP representa hasta el 4,9 % de las células, en comparación con las células tratadas con verapamilo (el control negativo) (Figura 11A, B). Este tratamiento con verapamilo se basó en la inhibición de verapamilo de las bombas iónicas responsables de la exclusión del colorante Hoechst 33342, permitiendo de este modo que se vean las células SP [38]. La tinción de las células 199bSC1 y 199bMC1 indicó que se sometió a ablación a la SP, ya que no había diferencias significativas entre la muestra tratada con Hoechst y las muestras de Hoechst más verapamilo (Figura 11C-F).

[0062] También se sabe que las células madre tumorales del sistema nervioso central expresan el antígeno CD133, y que estas células son únicamente capaces de formar tumores en ratones NOD-SCID [18,39]. Además, la ruta Notch tiene una función esencial en el proceso de auto-renovación, conduciendo su inhibición al agotamiento de células Daoy positivas para CD133 (CD133+) a través de la inducción de la apoptosis de las células de tipo progenitor [36]. Recientemente se demostró que las células Daoy CD133+ promueven el crecimiento tumoral en el costado de los ratones sin pelo, mientras que las células CD133 no [40]. Por estas razones, se evaluó la positividad para CD133 de las células Daoy en comparación con los clones estables 199bSC1 y 199bMC1 (Figura 2). En este caso, las células de tipo silvestre fueron el 14,8 % de CD133+, mientras que en los clones estables 199bSC1 y 199bMC1 esto se redujo al 2,4 % y al 6,5 % de CD133+, respectivamente (Figura 2C-F). Por lo tanto, esto demostró una función para miR-199b-5p en la regulación negativa de esta fracción de células iniciadoras de tumor.

La sobreexpresión de HES1 rescata el fenotipo del clon miR-199b-5p.

[0063] Para confirmar que el fenotipo celular está directamente correlacionado con la regulación descendente de HES1, se realizaron experimentos de rescate celular *in vitro*. Se escogió rescatar el fenotipo más consistente, demostrado por el clon estable 199bSC1. Cuando se clonó el ADNc de HES1 de longitud completa y se transfectó

en el clon estable 199bSC1 de células Daoy, se restableció la expresión de HES1, según se evaluó por inmunotransferencia (Figura 3A). También se observó la re-expresión de ciclina D1, que se regula por descenso en el clon estable 199bSC1. La expresión de HES1 restaurada también invirtió los efectos de miR-199b-5p sobre la proliferación celular (Figura 3B). Al mismo tiempo, la transfección de ADNc de HES1 en el clon 199bSC1 disminuyó la inducción de bHLH pro-neurales y marcadores de diferenciación, y aumentó los niveles de genes de proliferación (Figura 3C). Además, la transfección transitoria de ADNc de HES1 en el clon estable 199bSC1 condujo a un aumento en el porcentaje de células en estadio S, y una eliminación del bloque en la fase G0-G1 (Figura 3D). Esto era opuesto a los efectos observados en el clon estable 199bSC1 que sobreexpresó miR-199b-5p (véase la Figura 1C y la Figura 3C). También se evaluaron los efectos de la expresión restaurada de HES1 en la SP del clon estable 199bSC1. Cuando se evaluaron las células transfectadas con HES1 (positivas para GFP) para determinar su capacidad para excluir el colorante Hoechst, mostraron un aumento mínimo en la SP, de hasta el 1,3 %. Aunque superior a la medida para los clones estables 199b (Figura 3E-H), todavía estaba por debajo del nivel de células SP para las células de tipo silvestre (Figura 11). Esto es probablemente debido al corto tiempo de re-expresión de HES1 después de la transfección transitoria, que podría no ser suficiente para permitir el rescate del fenotipo completo. Después se trató de rescatar los efectos en el compartimiento CD133; sin embargo, la transfección transitoria de HES1 en el clon 199bSC1 no dio como resultado un aumento significativo de las células CD133+. Se cree que esto se debe al corto tiempo de transfección transitoria, que no permite una reorganización de la jerarquía de células Daoy.

20 El crecimiento tumoral se reduce en los xenoinjertos obtenidos a partir del clon 199SC1 estable.

[0064] Los hallazgos aquí indicaron que miR-199b-5p es un inhibidor potencial de la formación tumoral. Por lo tanto, para investigar la función de miR-199b-5p en un modelo de tumor *in vivo*, se estabilizaron los clones 199bSC1 y Daoy de control con un vector de expresión que portaba ADNc de luciferasa. Los clones obtenidos se ensayaron para determinar los niveles de expresión de la luciferasa y también se validaron para la retención del fenotipo parental, en cuando la expresión tanto de HES1 como de miR-199b-5p (véase la Figura 12A-D). Estos clones de Daoy estables 199b-Luc1 y Ctl-Luc-4 se inyectaron después en los costados izquierdo y derecho, respectivamente, de cinco ratones atímicos desnudos/sin pelo. El crecimiento tumoral se evaluó mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* (BLI) semanales de ratones inyectados. A las ocho semanas, todos los ratones mostraron masas visibles en cada costado de control, mientras que sólo tres costados inyectados con 199b-Luc1 mostraron injerto tumoral. En general, se observó una diferencia significativa en los volúmenes tumorales entre los costados de control y los costados de miR-199b-5p (Figura 4A). Las mediciones de bioluminiscencia mostraron reducciones significativas en la emisión de los lados miR-199b-5p durante el crecimiento tumoral, en comparación con los lados de control (por ejemplo, ratón n.º 4, Figura 4B). Después de nueve semanas, cuatro de los cinco ratones mostraron diferencias estadísticamente significativas en estas señales de bioluminiscencia entre los lados de control y los lados contrarios de miR-199b-5p (Figura 4C). Tomados en conjunto, estos datos muestran que miR-199b-5p puede alterar la formación tumoral *in vivo* en ratones atímicos sin pelo/sin pelo. Los tumores de xenoinjerto del ratón n.º 5 y del ratón n.º 4 se explantaron y se analizaron para determinar la expresión de miR-199b-5p y HES1 y se evaluaron histopatológicamente (Figura 12 E-H).

[0065] Para investigar adicionalmente la capacidad de miR-199b-5p para regular el crecimiento de MB, se inyectó ortotópicamente el clon estable 199bSC1 en el cuarto ventrículo de ratones sin pelo de 5 semanas de edad (Figura 4D, E). Después de cuatro semanas de control no invasivo *in vivo* del crecimiento tumoral por obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI), en ratones inyectados con el clon 199bSC1, el crecimiento tumoral era considerablemente más bajo que el observado en el lado inyectado de las células de control (CTL). Como confirmación adicional de estos efectos, también se inyectaron las células CTL infectadas con un adenovirus que codificaba para miR-199b: acorde con los hallazgos anteriores, estos ratones también mostraron una reducción de BLI después de 4 semanas (Figura 4F). Se muestran adquisiciones de BLI adicionales, después de 8 semanas desde la implantación de las células en la Figura 4G. En este momento, se sacrificaron dos ratones y se analizaron adicionalmente para determinar la histopatología. La tinción de hematoxilina-eosina de los tejidos congelados mostró una masa tumoral en el cerebelo de animales inyectados con AdV5-Mock#2 y AdV5-199b#3. Las secciones histológicas congeladas paralelas en serie se examinaron mediante microscopía de fluorescencia para determinar la proteína de fluorescencia verde endógena (GFP) expresada por células infectadas con adenovirus. Después, se evaluó la expresión de la proteína HES1 mediante tinción inmunohistoquímica de otros tejidos incluidos en parafina, usando un anticuerpo anti-HES1. En general, se evaluaron los niveles de persistencia de la expresión de adenovirus en células infectadas, como la regulación descendente de la expresión de HES1 debido a miR199b que portaba la expresión de adenovirus, siguiendo así el crecimiento tumoral en el tiempo por BLI, véase la Figura 4G-H, y la tinción de anticuerpos (Hes1, Ki67, Gabra6, Nestina, Math-3) Figura 12 L-M complementaria. Después, dos ratones sin pelo adicionales (AdV5-Mock#7; AdV5-199b#5) se sometieron a estudios PET-CT 12 semanas después de la inyección, para evaluar la actividad proliferativa del tumor (Figura 5A, B). Los datos de adquisición complementarios de bioluminiscencia con dos videos mostraron la reconstrucción tridimensional de los dos ratones inyectados con AdV5-Mock y con AdV5-199b, respectivamente (Figura 14). Estos análisis mostraron una reducción significativa de la masa tumoral en el animal AdV5-199b#5, en comparación con los ratones control AdV5-Mock#7, proporcionando

también los análisis PET-CT volúmenes tumorales (0.024 cm³ frente a 0.044 cm³, respectivamente). En general, estos datos indican un efecto beneficioso de la sobreexpresión de miR199b-5p, como una influencia negativa en el crecimiento tumoral de las células de MB en este modelo de ratón sin pelo de xenoinjerto ortotópico.

5 Expresión de miR-199b-5p en tumores de meduloblastoma humano.

[0066] Para determinar si el miR-199b-5p se expresa eficazmente en cerebelos pediátricos humanos sanos, se usaron 13 muestras de control obtenidas del NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders, en la University of Maryland, Estados Unidos. Se midió la expresión de miR-199b-5p, comparando cinco muestras de cerebelo obtenidas de niños de 0-1 años con seis de niños de 13-16 años (Figura 6A). El MiR-199b-5p mostró una mayor expresión en los explantes de los controles sanos más jóvenes (prueba de Mann-Whitney, $P = 0,006$).

[0067] Para determinar si la expresión de miR-199b-5p tiene un papel en el MB humano, se analizaron muestras de una cohorte de 61 pacientes con MB (véase Procedimientos experimentales). De hecho, ya se ha mostrado que los niveles de proteína HES1 se correlacionan con resultados negativos en pacientes de MB [24]. Después, toda la población pacientes ($n = 61$) se dividió en dos grupos, como expresión baja frente a alta de miR-199b-5p, en base a la media global. La distribución de la expresión de miR-199b-5p entre los casos no metastásicos (M0) y metastásicos (M1, M2 y M3) mostró que la expresión de miR-199b-5p en los casos no metastásicos fue significativamente mayor que en los casos metastásicos ($P = 0,001$, prueba de ji-cuadrado de Pearson, Figura 6B).

[0068] En el subconjunto de pacientes donde estaba disponible información de seguimiento ($n = 45$), la curva de supervivencia para los pacientes que expresaron miR-199b a niveles altos mostró una tendencia positiva, con una mejor supervivencia global que los pacientes de baja expresión. Sin embargo, la prueba de rango logarítmico de las curvas de Kaplan-Meier no mostró una diferencia significativa ($P = 0,182$; Figura 6C), probablemente debido al número limitado de pacientes con seguimiento a largo plazo.

[0069] Estos datos que muestran la regulación descendente de miR-199b-5p en MB metastásicos indican un mecanismo de silenciamiento a través de alteraciones epigenéticas o genéticas. Por lo tanto, se ensayó la expresión de miR-199b-5p por PCR en tiempo real en un panel de líneas celulares de MB después de la inducción de la desmetilación con 5-aza-desoxicidina (Figura 6D). De hecho, dos líneas celulares (Med8 y UV238) mostraron una regulación ascendente significativa de miR-199b-5p, apoyando de esta manera la hipótesis de control epigenético de la expresión de miR-199b-5p. Es necesario realizar estudios adicionales para identificar este mecanismo de regulación regulado de la acción a través de la inactivación epigenética de la expresión de miR199b-5p durante el desarrollo tumoral.

Información de soporte

[0070] A través de los análisis de predicción de dianas, se observó que miR-199a-5p y miR-199b-5p se dirigían potencialmente a HES1, con altos valores de puntuación. Para determinar si esta unión potencial se tradujo en una regulación eficiente de HES1 en células vivas, se transfectaron ambos miRNA en la línea celular HEK-293 (Figura 9A, B). Se clonaron los pre-miRNA en dos construcciones donde la expresión se impulsó por el promotor de CMV. Después de 48 h de transfección transitoria, de hecho, el miR-199b-5p reguló en descenso la expresión de HES1. En esta fase, también se pudieron excluir los efectos de miR-199a-5p en la 3'UTR de HES1 en diferentes tipos de células.

[0071] Después, se evaluaron los niveles de expresión de miR-199b-5p maduro utilizando un enfoque en tiempo real (véase Procedimientos experimentales) en células Daoy y D283MED (Figura 9C). El MiR-199b-5p mostró bajos niveles de expresión en células SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma, mientras que las células Daoy expresaron más miR-199b-5p. También hubo diferencias en los niveles de expresión de los dos miRNA en la línea celular de MB D283MED, que se obtuvo a partir del líquido de ascitis de un paciente con MB metastásico, a diferencia de la línea celular Daoy [1]. Aquí, la expresión de miR-199b-5p fue 10^4 veces menor en comparación con las células Daoy, lo que refleja potencialmente los diferentes orígenes del tipo de células tumorales [2]. También se evaluó la expresión de miR-199a* (datos no mostrados), que también se conoce como miR-199a-3p, y que recientemente se ha relacionado con el protooncogen MET [3]. Después de la sobreexpresión de pre-miR-199a, no se observó sobreexpresión de miR-199a* en las células Daoy. Esto se debe probablemente a un procesamiento específico de pre-miR-199b-5p hacia la producción de miR-199a (datos no mostrados). La expresión de MiR-199b-5p también se evaluó en tejidos humanos normales (Figura 9D): su expresión era alta en el duodeno y los ganglios linfáticos, observando menor expresión en el cerebro (entero) y la corteza adultos.

[0072] Para confirmar los efectos de miR-199b-5p en diferentes líneas celulares de MB, se transfectaron de forma transitoria células D283MED y se evaluó la regulación descendente de HES1 mediante transferencia Western. Como se muestra en la Figura 9G, la sobreexpresión de miR-199b-5p condujo a una disminución de los niveles de proteína HES1. Este efecto sobre la proteína HES1 se traduce en una reducción en la proliferación celular, según se evaluó

mediante el ensayo MTS (Figura 10F). En este caso, se compararon las líneas celulares D283MED y ONS76 transfectadas transitoriamente con miR-199b-5p; en ambos casos se observó una disminución de la proliferación, en comparación con las células transfectadas mock.

- 5 **[0073]** Por lo tanto, se cuestionó si miR-199b-5p está implicado en el control de la proliferación celular a niveles endógenos. Para responder a esto, se utilizó un 2-O-metil-oligoribonucleótido dirigido contra la secuencia madura de miR-199b-5p (199b-OM), para disminuir sus niveles endógenos. Dado que las células Daoy mostraron las cantidades más altas de miR-199b-5p entre las líneas celulares de MB ensayadas (datos no mostrados), se transfectaron con 199b-OM (Figura 10G). Las células mostraron una mayor velocidad de proliferación *in vitro*, en comparación con la velocidad de proliferación de las células Daoy transfectadas con un OM de control (un 2-O-metil oligoribonucleótido desordenado).

Expresión de mmu-miR-199b-5p en el desarrollo del cerebelo

- 15 **[0074]** Para abordar la cuestión de cómo se expresa mir199 durante el desarrollo del cerebelo, se aprovechó el homólogo murino mmu-miR-199b-5p y se ensayó su expresión en el cerebelo de ratón en desarrollo. Se aplicó la metodología desarrollada para el uso de sondas de ácido nucleico bloqueadas etiquetadas con digoxigenina (DIG). Se utilizaron embriones en E14.5 y cerebros de ratón recién nacidos en P0 en experimentos de hibridación *in situ*, como se muestra en la Figura 10A. La expresión de mmu-miR-199b-5p se comparó con la de miR-124a como el control, que se sabe que es un miRNA abundante en el sistema nervioso central. La expresión de mmu-miR-199b-5p fue más difusa, en comparación con miR-124a. Además, la expresión de mmu-miR-199b-5p disminuyó con el desarrollo del cerebelo, mientras que miR-124a conservó su expresión en la capa de células granulares internas (IGL) y en las neuronas de Purkinje. A continuación, la expresión de mmu-miR-199b-5p se evaluó en el cerebelo de ratón en diferentes fases de desarrollo, midiendo los niveles de miRNA maduro y a través de sus análisis de expresión usando PCR en tiempo real. Los datos mostraron que incluso si mmu-miR-199b-5p se expresaba en niveles más bajos comparados con miR-124a, la expresión de mmu-miR-199b-5p se regula en el desarrollo, que disminuyó a partir de los días embrionarios 16,5 hasta el cerebelo de ratón desarrollado adulto (Figura 10B).

Regulación de MiR-199b-5p de otras dianas potenciales.

- 30 **[0075]** Entre las dianas predichas de miR-199b-5p, se encuentra la cinasa GSK3- β , una proteína implicada en la transducción de señal de las rutas Shh y Wnt, y por lo tanto, una cinasa crucial en las rutas que regulan la homeostasis de células cerebelosas. Por esta razón, se evaluó la capacidad de miR-199b-5p para regular por descenso GSK3- β utilizando el clon estable 199bSC1 ya obtenido. Este clon no mostró ninguna reducción significativa en los niveles de la proteína GSK3- β (Figura 10 C). Este efecto se puede explicar de acuerdo con la 3'UTR de GSK3- β que no es accesible para la unión con miR-199b-5p, como se sugiere de hecho por el alto $\Delta\Delta G$ evaluado por el algoritmo Pita (véase la Tabla 3; [4]). También se seleccionaron otros tres genes a ensayar para determinar su regulación potencial por miR-199b-5p: Nanog, NHLH2 y ciclina L1. Cuando se regulan por descenso, estos genes pueden conducir a un fenotipo similar al que se observa en los clones estables miR-199b-5p. No se detectó ningún efecto de regulación descendente de miR-199b-5p en estas 3'UTR génicas seleccionadas (Figura 10 D). Más recientemente, se ha demostrado que miR-199a* regula el protooncogen MET [3]. Dado que comparte la misma secuencia que miR-199b-5p, será de interés comprobar los niveles de este protooncogen en estos análisis, lo que será una cuestión de futuros estudios.

45 **Tabla 3**

Genes diana	Función génica	Análisis Miranda		Análisis PITA	
		Puntuación	Valor de p	Semilla	$\Delta\Delta G$
HES1	Factor de transcripción	18,2355	5,80E-03	8:0:1	-8,92
NTRK1	Receptor de tirosina cinasa neurotrófico	19,4586	1,70E-03	8:0:1	1,21
CCNL1	Ciclina L1	17,4364	3,60E-05	8:0:0	-10,28
CDK9	Cinasa 9 dependiente de ciclina	16,488	1,40E-04	8:0:0	-5,03
HIRA	Homólogo A defectuoso de la regulación del ciclo celular de histona HIR	16,224	2,10E-04	8:0:1	-2,52

HOXC5	Proteína Homeobox Hox-C5	16,157	8,21 E-03	8:0:1	0,09
MAP2K5	Proteína cinasa 5 activada por mitógeno de especificidad dual	16,2892	4,35E-02	8:0:1	-4,13
MAP3K12	Proteína cinasa 12 activada por mitógeno	15,8078	6,10E-03	8:0:1	-6,37
NANOG	Proteína Homeobox NANOG	17,3329	0,01486	8:0:1	-7,65
NHLH2	Proteína 2 hélice-bucle-hélice (HEN2)	16,0155	4,62E-03	8:0:0	-7,59
OTX1	Proteína Homeobox OTX1	16,1851	2,04E-04	8:0:1	-8,68
GSK3B	Glucógeno · sintasa cinasa-3 beta	16,4041	3,80E-02	8:0:0	0,03

Creación de células Daoy bioluminiscentes que sobreexpresan miR-199b-5p para estudios *in vivo*.

5 **[0076]** La obtención de imágenes *in vivo* basadas en luciferasa ha emergido recientemente como una potente herramienta para investigar el injerto potencial de células tumorales en modelos animales ortotópicos [5]. Para determinar la función de miR-199b-5p en un modelo de tumor *in vivo*, se estabilizaron los clones 199bSC1 y Daoy de control con un vector de expresión que portaba ADNc de luciferasa. Los clones se ensayaron para evaluar sus niveles de expresión de luciferasa (Figura 12A, B): estos experimentos *in vitro* mostraron altas correlaciones entre el número de células y las mediciones de bioluminiscencia. Por lo tanto, esta expresión de luciferasa permitió la obtención de imágenes no invasiva de la bioluminiscencia asociada al tumor y la cuantificación del crecimiento tumoral. Los clones estables obtenidos se validaron para determinar su retención del fenotipo parental, tanto en términos de expresión de miR-199b-5p como de HES1, como se ilustra en la Figura complementaria 12 C, D. El xenoinjerto del ratón n.º 4 se explantó y se procesó para determinar su morfología, utilizando tinción con hematoxilina y eosina. Los tumores formados en el lado de control eran más invasivos y agresivos que los formados en el lado inyectado con miR-199b-5p, como puede observarse por la invasión del anterior en el tejido muscular (Figura 12E, flechas de color negro). La tinción con un anticuerpo dirigido contra Nestina reveló que el tumor formado en el lado de miR-199b-5p mostró menos células con la característica de progenitores neurales, de acuerdo con la regulación descendente de la ruta Notch (Figura 12 G, H) [6]. Los explantes del ratón n.º 5, que formaban tumores tanto en los lados inyectados con 199b como de control, mostraron una pérdida de expresión del transgén (miR-199b-5p), que podía ser responsable de la recuperación del potencial tumoral (Figura 12 I).

15 **[0077]** Para caracterizar adicionalmente la capacidad de miR-199b-5p para contrarrestar el crecimiento tumoral *in vivo*, se establecieron implantes ortotópicos de células Ctl-Luc1 y 199b-Luc4. Además, también se inyectaron células Daoy de tipo silvestre que se infectaron previamente con un adenovirus recombinante que expresaba miR-199b-5p (AdV5-199b), seguido de bioluminiscencia por imagen *in vivo* (tecnologías BLI). Se usaron las células tanto infectadas con 199b-Luc4 como con AdV-199b como controles, y el clon Ctl-Luc1 se infectó después con un virus AdV5-mock. Los resultados a las 4 semanas de la inyección se muestran en la Figura 5, con más análisis BLI de los ratones mostrados a las 4 y 8 semanas (Figuras 4G y 14).

30 **La línea celular Daoy tratada con DAPT muestra un aumento de la expresión endógena de miR-199b y una firma de expresión génica de tipo célula madre.**

35 **[0078]** Para determinar si podrían aumentar los niveles endógenos de miR-199b-5p, se trataron líneas de células Daoy con éster t-butílico de *N*-[*N*-(3,5-difluorofenacetil)-*l*-alanil]-*S*-fenilglicina (DAPT, Sigma-Aldrich), que bloquea eficientemente el complejo de presenilina-secretasa, y como consecuencia, evita eficazmente la activación de la respuesta Notch [7, 8]. Como se muestra en la Figura 13A, se encontró que tras el tratamiento con DAPT, el nivel de miR-199b-5p aumentó 9 veces a las 12 h. Después, esta activación se siguió de una rápida inhibición de su expresión, dentro de las 24 h del tratamiento. Después, estos datos se apoyaron por la verificación de los niveles de HES1 utilizando análisis de transferencia Western (Figura 13B), indicando de este modo que tras la expresión de miR-199b-5p, se observó la inhibición de los niveles de proteína HES1. Estos datos indujeron a determinar en qué medida puede influir la pérdida de HES1 y la sobreexpresión de miR199 en la firma de expresión génica de los genes implicados en las células madre embrionarias (ES) y las células madre de cáncer tras el tratamiento con DAPT.

45 **[0079]** Siguiendo los resultados presentados en un estudio reciente [9], se aplicó la detección cuantitativa en tiempo real para los perfiles de expresión de los genes (lista de los 8 mejores) que se enriquecieron y se asociaron a la identidad de las células madre embrionarias (ES), y las propiedades de "troncalidad" de varios tumores sólidos,

incluyendo de mama, vejiga y glioma. Aquí, se seleccionaron los marcadores de genes de células madre (MB y glioblastoma), tales como CD133 y c-Myc, y después los genes que son los reguladores clave de la identidad de las células ES: Oct4, KFL5 y Nanog. También se examinaron los genes asociados con la función de células madre/progenitoras adultas, la proliferación de ES y células tumorales y/o avance del cáncer. De acuerdo con estos criterios, la lista de genes comprendía: CD133, c-Myc, Oct4, KFL5, Nanog, TCF7L1, HMGA1, HMGB3, ZIC1, MYBL2, TEAD4 e ILF3. Como se muestra en la Figura complementaria S5C, la expresión de los genes CD133 y c-Myc se reguló en descenso en la línea celular Daoy inducida con DAPT. Después, también se observó que los niveles de expresión de los genes Oct4, Nanog, KFL5, TCF7L1, HMGA1, HMGB3, ZIC1, MYBL2 y TEAD4 estaban regulados en descenso en la sobreexpresión inducida por DAPT de Daoy de miR-199b-5p, cebadores y los valores $2^{\Delta DCt}$ en bruto se enumeran en la Pestaña S3. Esto confirmó así que la regulación ascendente de miR-199b-5p es concurrente con la inhibición de la ruta Notch, que regula las poblaciones de células madre, como se observa por los marcadores seleccionados que ya se sabe que están implicados "directamente" o "indirectamente" en este fenómeno. En la actualidad, queda por determinar en qué medida la sobreexpresión de miR-199b-5p puede modularse por la inhibición de la ruta Notch. Estas preguntas serán una cuestión para futuros estudios.

[0080] Estudios adicionales han demostrado la sobreexpresión de los genes PDGFR-A, PDGFR-B y SPARC en pacientes con MB metastásico y en líneas celulares de MB [10, 11]. Por lo tanto, también se analizó la expresión de los genes PDGFR-A, PDGFR-B y SPARC en el modelo de línea celular Daoy como se ha presentado anteriormente, con su regulación ascendente de miR199b endógeno en el tratamiento con DAPT. Como se muestra en la Figura 13D, la expresión de PDGFR-B y SPARC se redujo en descenso en la línea celular Daoy tratada con DAPT, en comparación con el vehículo de sólo tratamiento, mientras que también se observó la baja regulación en ascenso de PDGFR-A. En este momento, queda por determinar si este bajo aumento en la expresión de PDGFR-A a través de la ruta RAS/MAPK será suficiente para impulsar el potencial metastásico de células de MB que sobreexpresan miR-199b-5p; este es un efecto opuesto al que se obtuvo verificando la expresión de miR199b-5p en los tumores. Estos resultados son también de alguna manera contradictorios con los datos de la bibliografía, aunque en el marco de la fe de erratas [11], la sobreexpresión de PDGFR-A encontrada en los tumores metastásicos de MB se juzgó mal debido a una secuencia incorrecta y la anotación de la sonda por GenBank y Affymetrix: aunque la secuencia de GenBank J03278 incluye la región de codificación completa de PDGFR-B, se dio el locus como "PDGFRA", y la sonda 1771 de Affymetrix se anotó como "ARNm del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas J03278 HUMPDGFR (PDGF)". En estos nuevos datos notificados¹⁰, se observó que el PDGFR-B estaba regulado en ascenso en los tumores metastásicos de MB. Estos últimos resultados están acordes con lo observado en las líneas celulares Daoy de los inventores, donde la sobreexpresión de miR-199b-5p tras el tratamiento con DAPT indujo la regulación en descenso de la expresión de PDGFR-B y SPARC. Esto a su vez se correlaciona con la pérdida de expresión de miR199b-5p en pacientes metastásicos, y definitivamente fortalece la importancia de la expresión de miR-199b-5p y su participación en el desarrollo del cáncer de MB, alterando su potencial metastásico. Finalmente, los datos aquí presentados confirmaron el papel de la sobreexpresión de miR-199b-5p vinculando su función principal para la inhibición del mantenimiento de células madre ES y células madre de cáncer operado por los genes ya implicados en estos mecanismos de acción.

[0081] Recientemente, un patrón de expresión específico de pacientes de MB infantiles mostró nueve miRNA, que incluían miR-199b-5p, también agrupados con tumores de sobreexpresión de ErbB2 y/o c-Myc [12]. En particular, mostraron una mayor expresión de miR-135a y b, miR-10b, miR-125b y miR-153, mientras que miR-199b mostró una menor expresión en estos pacientes positivos para ErbB2. Cabe apreciarse que, Gilbertson et al. [13] han mostrado que los tumores positivos para ErbB2-HER4 se comportan como marcadores pronósticos independientes en el MB infantil, y en particular Erb-2 es un marcador de peor pronóstico dado su efecto de supervivencia negativo en MB. En general, los resultados de la bibliografía fortalecen aún más la importancia de miR199b-5p, cuya expresión se regula en descenso en los tumores de MB y se asocia a la agresividad de estas cohortes positivas para Erb-2.

Obtención de imágenes moleculares de alta resolución por análisis PET y SPECT-CT para animales pequeños.

Preparación de los animales y obtención de imágenes por PET/CT

[0082] Los ratones se mantuvieron en una jaula ventilada (26 °C) durante 1 h antes de los estudios por imágenes. La anestesia se realizó con administración intraperitoneal de una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) (volumen de inyección, 100 µl/10 g). Se realizó un PET 1 h después de la administración de 3'-desoxi-3'-[¹⁸F]fluorotimidina ([¹⁸F]FLT), un marcador de proliferación tumoral (50 µl, 7,4 MBq, tiempo de exploración, 18 min), en una vena caudal lateral, usando un escáner PET para animales (GE Healthcare eXplore Vista, FWHM 1,6 mm). Se realizaron estudios de TC de alta resolución (GE Healthcare eXplore Locus, resolución espacial, 45 µm) a las 24 h del PET.

Análisis de datos

[0083] Se calcularon los valores de absorción estandarizados (SUV) máximos (SUV_{máx}) y medios (SUV) a partir de los estudios PET (SUV = actividad tisular (MBq/cc)/[dosis inyectada (MBq)/peso corporal (g)]). Las imágenes de PET/CT se procesaron posteriormente para obtener reconstrucciones multiplanares (MPR), proyecciones de máxima intensidad (MIP), renderizado de volumen tridimensional e imágenes de fusión, usando Osirix 3.3 (sistema operativo MAC OS 10.5). Se obtuvieron reconstrucciones tridimensionales adicionales utilizando MicroView (GE eXplore Locus).

[0084] Los volúmenes de lesión se calcularon a partir de datos de PET usando un software desarrollado internamente (basado en IDL, ITT Vis Inc), resumiendo todos los voxels espacialmente conectados con SUV > SUV_{máx} al 50 %. Los perfiles de lesión definidos con estos procedimientos se utilizaron para la comparación basada en ROI entre AdV5-Mock y AdV5-199b.

ANÁLISIS

[0085] Las interconexiones entre las rutas de señalización alteradas en MB permanecen en gran parte desconocidas, y todavía es difícil definir una estratificación de pacientes específica de acuerdo con las clases de riesgo que reducirán la mortalidad y la morbilidad asociadas a la terapia. En el presente estudio, se ha identificado un mecanismo de regulación del gen HES1 a través del miRNA miR-199b-5p. HES1 es un regulador clave del desarrollo del cerebelo, como se indica por lo hallazgos recientes de que el tratamiento de las células granulares cerebelares con Shh aumenta los niveles de HES1 [20]. Esto sugiere que HES1 es una diana transcripcional de las cascadas de señalización Shh y Notch2.

[0086] Se indica aquí un nivel novedoso de regulación de la expresión de HES1 que se impulsa por miR-199b-5p, que se une a la 3'UTR de HES1 y conduce a una traducción improductiva. Cabe apreciarse que, también se han investigado las acciones de miR-199b-5p en una construcción indicadora fusionada con la 3'UTR de NHLH2, ciclina L1 y Nanog (Figura 10D). Entre las dianas predichas para miR-199b-5p, que se obtuvieron utilizando dos algoritmos diferentes (Tabla 3), estos genes fueron posibles candidatos relacionados con el fenotipo obtenido después de la sobreexpresión de miR-199b. No obstante, no se obtuvo una regulación descendente de la actividad indicadora al ensayarse en las mismas condiciones en las que se obtuvieron efectos sobre la 3'UTR de HES1. Además, el clon estable 199bSC1 tiene un nivel de proteína GSK3- β comparable con el control. Cabe apreciarse que, cuando se analiza de acuerdo con el algoritmo Pita, el valor de $\Delta\Delta G$ para la unión de miR-199b-5p a la 3'UTR de GSK3- β es muy alto, lo que indica una mala accesibilidad a la 3'UTR [41] (Tabla 3). Recientemente también se ha demostrado que miR-199a*, que tiene la misma secuencia que miR-199b-5p, está implicado en la activación de caspasa actuando potencialmente a través de la regulación descendente del protooncogen Met [42]. Será también de interés para futuros estudios determinar la regulación descendente de esta diana por miR-199b, incluso si parece improbable debido a la falta de inducción de la apoptosis después de la sobreexpresión de miR-199b en estos sistemas celulares.

[0087] El análisis de los clones de miR-199b-5p de sobreexpresión sugirió que miR-199b-5p puede alterar el potencial de proliferación y de injerto de las células de MB. De hecho, la pérdida de la ciclina D1 en los clones de miR-199b-5p de sobreexpresión es un recordatorio de los efectos similares observados en los ratones *Ccnd1-1*, que han disminuido la proliferación temprana de GNP y la ataxia temprana como consecuencia de un retraso en la adquisición de la función cerebelar normal, afectando así la progresión de las lesiones preneoplásicas a los MB [43].

[0088] Nuestros datos también están de acuerdo con los datos *in vivo* informados de células murinas genéticamente inactivadas para *Hes1*. Mientras que los efectos de miR-199b-5p podrían explicarse por el desencadenamiento de la apoptosis, estos ensayos citofluorométricos sugieren que la alteración de la proliferación de células de MB no está vinculada a la apoptosis extensa de las células que sobreexpresan miR-199b-5p (véase el ensayo del ciclo celular en la Figura 1A). Esto es acorde con los datos informados para los progenitores neurales obtenidos a partir de ratones *Hes1-/-*, donde las indicaciones apoptóticas sólo se observaron en tipos de células restringidos [22].

[0089] La correlación que se muestra entre miR-199b-5p y el estadio M tumoral indica que los niveles de expresión de miR-199b-5p pueden ser investigados concomitantemente con la resección tumoral. Esto permitirá identificar un subconjunto de pacientes que deben desarrollar un tumor agresivo y tener una futura formación de metástasis, señalando que la enfermedad diseminada es el factor independiente más potente asociado con la mala supervivencia. A pesar de la correlación con el estado M, la sobreexpresión de miR-199b-5p no condujo a una disminución de la motilidad celular de las células Daoy (Figura 10 E). Esto bien puede ser debido a la motilidad extremadamente alta de las células Daoy, lo que indica que para superar este fenotipo, ha de tener lugar un paso adicional más allá de la regulación de la ruta Notch. Sin embargo, cabe apreciarse que, la expresión de PDGFR-B y SPARC, dos genes recientemente correlacionados con MB metastásico [44, 45], se reduce en presencia de la

sobreexpresión de miR-199b-5p, como se muestra en la Figura 13D y se describe en Materiales complementarios.

[0090] A la luz de los datos sobre la regulación de la ruta Notch a través de la modulación de miR-199b-5p, será de interés enfocar futuros estudios sobre el papel de los genes regulados por Notch en pacientes con MB metastásico. Adicionalmente, el desarrollo de modelos de ratón que mejor reproduzcan la enfermedad humana es una tarea importante. Dentro de este escenario, los hallazgos de que el modelo de ratón Smo/Smo homocigoto tiene propagación leptomeníngea confirma la participación de la ruta Notch en la regulación del crecimiento de MB [25, 46]. Como se muestra en la Figura 6 y en la Tabla 2, se muestra una gran variabilidad en los niveles de expresión de miR-199b-5p, lo que puede deberse a alteraciones cromosómicas genéticas o silenciamiento epigenético en un subconjunto de pacientes con peor resultado. Estos datos sobre un panel de líneas celulares de MB (véase la Figura 6D) apoyan esta última hipótesis. La razón por la que algunas de las líneas celulares de MB no responden al tratamiento con miR-199b creciente podría deberse a la pérdida genética del propio gen, o a una estricta regulación del tipo celular de la expresión de miR-199b, que refleja los diferentes orígenes de las líneas celulares.

[0091] En la actualidad, existe un creciente interés en la elucidación de los mecanismos que confieren propiedades únicas a las "células madre de cáncer" [47]. Recientemente, se demostró que las células CD133+ de glioblastoma tienen una mejor probabilidad de supervivencia después de la radiación ionizante, a través de la inducción de la reparación del ADN dañado [48]. De hecho, las células Daoy que expresan el antígeno CD133 son radio-resistentes, lo que apoya la hipótesis de que las células Daoy representan un modelo para el estudio de un compartimento de células madre de tumor [49]. Aquí, miR-199b-5p puede influir en esta población lateral y la población CD133+ de las células Daoy, concretamente, las células madre de cáncer.

[0092] Junto con CD133, también se evaluaron los niveles de expresión de varios genes de células madre de cáncer que recientemente se ha demostrado que están correlacionados con la agresividad de tumores sólidos; como se muestra en la Figura complementaria S5B, la expresión de estos genes es acorde con una reducción global en el fenotipo de "troncalidad" de células Daoy tratadas con éster *t*-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-1-alanil]-S-Fenilglicina (DAPT). Esto evita la activación de la respuesta Notch (véase Materiales complementarios), bloqueando así el complejo de presenilina-secretasa y potenciando la expresión de miR199b-5p [50, 51]. Hasta la fecha, este es el primer informe de que la expresión de un miRNA puede agotar este compartimento de células tumorales, lo que indica un interesante enfoque terapéutico para el direccionamiento de estas células en los tumores cerebrales.

[0093] Existe una fuerte indicación a partir de series publicadas de que los niños con meduloblastoma que se presenta en más de 3 años de edad se benefician enormemente de la radioterapia, pero el tratamiento de los niños más pequeños sigue siendo un desafío. La ausencia de diferencias significativas en las tasas de supervivencia entre los pacientes con excisión total o subtotal de MB apoya la opinión de que la extirpación total de MB puede evitarse cuando el riesgo de déficit neurológicos potenciales es alto. Ensayos recientes han demostrado un efecto beneficioso de la quimioterapia, aunque esto no se observó universalmente [52, 53]. Aquí, se prevé el uso y la administración de miR199b-5p *in situ* en el cerebelo de niños afectados por MB de menos de 3 años de edad (y positivos para HES1), para alterar así el mantenimiento de las células de cáncer CD133+ de inicio tumoral. Combinado con la quimioterapia, y con el potencial de abrogar la radioterapia y evitar el daño cerebral debido a la extirpación total del tumor, esto debería proporcionar una mejora general en los tratamientos actuales para el MB. Por lo tanto, se prevé la posibilidad de tratar los MB con el uso de partículas de lípidos de ácido nucleico encapsuladas estables (SNALP). Estas han demostrado ser eficaces en los primates no humanos para la administración sistémica, y pasarán la barrera hematoencefálica utilizando nanopartículas encapsuladas que contienen moléculas agomir 199b-5p [54]. La forma en que estos enfoques de terapia génica progresarán será además un problema para futuros estudios preclínicos en animales.

[0094] Como se ilustra en nuestro modelo (Figura 6E), se representan dos niveles de expresión diferentes de miR-199b-5p en pacientes M0 y M+, lo que podría ser debido a la regulación epigenética durante la carcinogénesis. En nuestro modelo "moderadamente alto", un aumento en la expresión de miR-199b-5p reprime HES1, que luego conduce a un aumento en la expresión génica de bHLH pro-neurales, impulsando a la célula hacia procesos de diferenciación. En el modelo "moderadamente bajo", la expresión de miR-199b-5p se reduce debido a mecanismos de control epigenéticos, y después se sobreexpresa HES1, lo que conduce a la proliferación celular y la inducción de SP y, por lo tanto, un aumento de las células CD133+. Como para muchos otros factores de transcripción, HES1 es un punto de integración entre diferentes rutas de transducción de señales, y su equilibrio de expresión determina las decisiones celulares fundamentales, tal como si se debe iniciar o no un programa de diferenciación. Con este escenario, miR-199b-5p se puede ver como parte de la ruta de transducción de señal de Notch compleja, como un afinador de los niveles de expresión del factor de transcripción de HES1 bHLH. Se puede considerar que estos fenómenos se producen en una diversidad de tejidos y cánceres en los que está implicada una ruta Notch activada.

Ejemplo 2: Evaluación de los efectos del tratamiento de líneas celulares de MB, carcinoma de colon y carcinoma de mama con el SNALP *miR199b-5p*.

Material y métodos:**Formulación de SNALP**

5 **[0095]** La tecnología SNALP (partículas de lípidos de ácidos nucleicos estables) empleada en otros trabajos (71-73) se formuló para el miR 199b-5p y su control desordenado relativo (denominado CTR en las figuras) por diferentes lípidos proporcionados por Lipoid GMBH (Cam, Suiza). Se utilizó un disolvente de calidad analítica de Carlo Erba Reagenti. En el proceso de extrusión, los filtros de policarbonato de 25 mm de membrana Nucleopore Track fueron de Whatman (Brentford, Reino Unido). Las membranas para diálisis, las sales y todos los demás productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich (Milán, Italia).

10 **[0096]** Las SNALP se prepararon mediante una mezcla lipídica compuesta por el aminolípido dioleodimetilamonio propano ionizable (DODAP), asociado a otros lípidos neutros, es decir, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina de huevo (EPC) y diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol 2000 (DSPE₂₀₀₀). La encapsulación de miRNA en SNALP se consiguió por la hidratación de una capa lipídica con una solución acuosa de miRNA. La suspensión resultante se pasó 10 veces a través de tres filtros de policarbonato de 100 nm apilados utilizando un sistema de extrusora de termobarril (Northern Lipids Inc., Vancouver, BC, Canadá). La preparación se dializó frente a tampón citrato 300 mM, pH 4,0 durante aproximadamente 1 h para eliminar el exceso de etanol; después, se dializó frente a HBS (HEPES 20 mM, NaCl 145 mM, pH 7,6) durante 12-18 h para eliminar el tampón citrato, neutralizar el DODAP y liberar cualquier miRNA asociado a la superficie de las vesículas. Los ODN no encapsulados se eliminaron mediante cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B. Las condiciones experimentales, es decir, la concentración en miRNA en la solución acuosa y la relación entre los diferentes lípidos, se optimizaron con el fin de encapsular altas cantidades de miRNA en las vesículas. Después de la preparación, las SNALP se solubilizaron en disolvente orgánico y el miRNA se extrajo en una solución acuosa y se cuantificó por espectrofotometría UV. El diámetro medio de las partículas y la distribución de tamaños de las diferentes formulaciones de SNALP se investigarán por espectroscopía de correlación de fotones (N5 Beckmann Coulter, Miami). El potencial zeta SNALP se determinó utilizando la tecnología M3-PALS (Zetasizer Nano, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Se prepararon nanocomplejos de miRNA/vaina lipídica mezclando una suspensión de liposomas catiónicos a base de metilsulfato de (N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP)/colesterol o DOTAP/colesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ con una solución acuosa que contenía protamina, y una solución acuosa de ADN de timo de ternera y miRNA o únicamente miRNA seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. En el caso de liposomas a base de DOTAP/colesterol, las partículas resultantes se incubaron luego con una dispersión de micelas de DSPE-PEG a 50 °C durante 10-15 minutos. Se dejó en reposo NP a temperatura ambiente durante 10 minutos. El porcentaje de miRNA en complejo se determinó por ultracentrifugación de los complejos y análisis UV del sobrenadante. Las condiciones de formulación, es decir, la concentración de miRNA en la solución acuosa inicial, la presencia de protamina, la cantidad de lípido catiónico utilizada, se optimizó para obtener la mayor eficacia de complejación. El diámetro medio de partícula y la distribución de tamaño de los nanocomplejos se investigó por la espectroscopia de correlación de fotones, mientras que el potencial zeta se determinó por tecnología M3-PALS.

35 **[0097]** La secuencia del oligonucleótido miR 199b-5p en las SNALP: CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC (SEQ ID NO:11) y su secuencia desordenada relativa CTR: gguuguauugcauuccuauuc (SEQ ID NO: 12).

Ensayo de proliferación MTS

40 **[0098]** El ensayo de proliferación (MTS) se realizó mediante el kit de ensayo de proliferación celular no radioactivo CellTiter96 AQueous (Promega) durante 72 h. Las líneas celulares daoy, MDA-231T y 4t1 tratadas con el SNALP de control y con el miR 199b-5p se transfirieron en 96 multipocillos a la concentración de 1000 y 3000 células (daoy, MDA-231T y 4t1, respectivamente) en 100 µl de medio completo. Para cada punto experimental se realizaron 5 réplicas. Después de 24, 48 y 72 h en cada pocillo se añadieron 20 µl de una solución 5 x. Después de 4 h se leyó la absorbancia del formazano a 490 nm mediante el contador multietiqueta Victor3 (Perkin Elmer).

Ensayo de la apoptosis

45 **[0099]** El ensayo de apoptosis en daoy, MDA-231T y 4t1 tratadas con SNALP de control y miR 199b-5p SNALP se hizo por FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) con el software CELL Quest versión 3.3. El análisis de anexina V se hizo mediante el anticuerpo Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Las células se tiñeron con yoduro de propidio y después se incubaron con un anticuerpo anti-anexina V FITC (Miltenyi Biotec), durante 10 minutos en la oscuridad a 4 °C. Después, las células se lavaron con PBS.

Hes1 de transferencia Western: véase a continuación**199b y CD133 RT sybr green: véase a continuación**

Cultivo celular

[0100] La línea celular de carcinoma de mama murino 4T1 se obtuvo mediante la Colección Americana de Cultivos Tipo (referencia 74, ATCC, Manassas, VA) y se subcultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma) complementado con FBS al 10 %, 10 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin (Celbio Pero, Milán, Italia). Las líneas celulares HT29 (carcinoma de colon humano) y MDA-231T (carcinoma de mama humano) se obtuvieron mediante la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM Sigma) con FBS al 10 %, 10 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin (Celbio Pero, Milán, Italia).

Resultados***MiR 199b-5p portado por SNALP en líneas celulares de meduloblastoma, carcinoma de mama y carcinoma de colon con evaluación de la toxicidad y de la inhibición de Hes1 diana.***

[0101] La forma madura de miR 199b-5p (secuencia ribonucleotídica) se formuló por SNALP como se describe en Material y métodos con el control relativo. Las líneas celulares Daoy, MDA231T, HT29 y 4T1 se trataron con 1 µg de oligonucleótido y se evaluó la vitalidad mediante un ensayo de proliferación MTS (Figura 17A y 18A). Como se muestra en las Figuras 17A, 18A, 20A-B, las líneas, mostraron una disminución de la velocidad de proliferación 24, 48 y 72 h después del tratamiento con miR 199b-5p SNALP con respecto al control. Después de 72 h de tratamiento, la expresión del miR 199b-5p se aumentó en ambas líneas celulares (Figura 17B e 18B). La toxicidad del tratamiento se evaluó mediante análisis de anexina V después de 72 h de tratamiento (Figura 17C y 18C). Como se muestra en las Figuras 17C y 18C, ninguna línea celular mostró diferencias en los niveles de apoptosis entre el control y el miR 199b-5p. Además, después de 72 h de tratamiento, se evaluó la expresión de Hes1 mediante transferencia Western como se muestra en las Figuras 17D y 18D. La sobreexpresión de miR 199b-5p por SNALP mostró la reducción de Hes1, lo que demuestra la eficacia del tratamiento.

Expresión del miR 199b-5p en tejidos de carcinoma de mama y de colon

[0102] La expresión del miR 199b-5p se evaluó en carcinoma de mama (29 tejidos) y carcinoma de colon (13 tejidos). Como se muestra en la figura 19, los niveles de expresión de miR 199b-5p son más bajos en los tejidos de carcinoma en relación con controles sanos, demostrando que también en estos tumores el miR 199b-5p es silenciado durante el avance tumoral. Los niveles de expresión del gen Cd133 también son inferiores en controles sanos en relación con los tejidos de carcinoma, ya que es un marcador de células madre de cáncer.

Bibliografía**[0103]**

1. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281-297.
2. Hammond SM (2006) MicroRNAs as oncogenes. Curr Opin Genet Dev 16: 4-9.
3. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 435: 839-843.
4. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15524-15529.
5. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, et al. (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. Biochem Biophys Res Commun 334: 1351-1358.
6. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. Mol Cancer Res 1: 882-891.
7. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, et al. (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 15805-15810.
8. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. Nature 449: 682-688.
9. Gilbertson RJ, Ellison DW (2008) The origins of medulloblastoma subtypes. Annu Rev Pathol 3: 341-365.
10. Buhren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S, Wiestler OD, et al. (2000) Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. J Neuropathol Exp Neurol 59: 229-240.
11. Katsetos CD, Krishna L, Frankfurter A, Karkavelas G, Wolfe DE, et al. (1995) A cytomorphological scheme of differentiating neuronal phenotypes in cerebellar medulloblastomas based on immunolocalization

- of class III beta-tubulin isotype (beta III) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Clin Neuropathol* 14: 72-81.
12. Marino S (2005) Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med* 11: 17-22.
- 5 13. MacDonald TJ (2008) Aggressive infantile embryonal tumors. *J Child Neurol* 23: 1195-1204.
14. Yang SY, Wang KC, Cho BK, Kim YY, Lim SY, et al. (2005) Radiation-induced cerebellar glioblastoma at the site of a treated medulloblastoma: case report. *J Neurosurg* 102: 417-422.
15. Patrice SJ, Tarbell NJ, Goumnerova LC, Shrieve DC, Black PM, et al. (1995) Results of radiosurgery in the management of recurrent and residual medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg* 22: 197-203.
- 10 16. Kombogiorgas D, Sgouros S, Walsh AR, Hockley AD, Stevens M, et al. (2007) Outcome of children with posterior fossa medulloblastoma: a single institution experience over the decade 1994-2003. *Childs Nerv Syst* 23: 399-405.
17. Huntly BJ, Gilliland DG (2005) Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature* 435: 1169-1170.
18. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23: 7267-7273.
19. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, et al. (2008) Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14: 135-145.
20. Solecki DJ, Liu XL, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME (2001) Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* 31: 557-568.
21. Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y, Shiota K, Nakanishi S, et al. (1994) Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *Embo J* 13: 1799-1805.
22. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, et al. (1995) Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* 9: 3136-3148.
- 25 23. Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, et al. (2000) The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci* 20: 283-293.
24. Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, et al. (2004) Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 64: 7787-7793.
- 30 25. Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, et al. (2004) The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Res* 64: 7794-7800.
26. Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, Liu J, Tanger E, et al. (2004) *Bmi1* is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428: 337-341.
- 35 27. Griffiths-Jones S (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32: D109-111.
28. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, et al. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9: 189-198.
29. Sandberg AA (2002) Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer: a personal view. *Am J Med Genet* 115: 173-182.
- 40 30. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, et al. (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 67: 6092-6099.
31. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, et al. (2008) Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 14: 419-427.
- 45 32. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, et al. (2006) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25: 2537-2545.
33. Izant JG, McIntosh JR (1980) Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 4741-4745.
- 50 34. Li XN, Parikh S, Shu Q, Jung HL, Chow CW, et al. (2004) Phenylbutyrate and phenylacetate induce differentiation and inhibit proliferation of human medulloblastoma cells. *Clin Cancer Res* 10: 1150-1159.
35. Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, et al. (2004) *Hes* genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131: 5539-5550.
- 55 36. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, et al. (2006) Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* 66: 7445-7452.
37. Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 781-786.
- 60 38. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-1806.
39. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, et al. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401.

40. Eberhart CG (2007) In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg Clin N Am* 18: 59-69, viii-ix.
41. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39: 1278-1284.
- 5 42. Kim S, Lee UJ, Kim MN, Lee EJ, Kim JY, et al. (2008) MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem* 283: 18158-18166.
43. Pogoriler J, Millen K, Utset M, Du W (2006) Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation. *Development* 133: 3929-3937.
- 10 44. Gilbertson RJ, Clifford SC (2003) PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* 35: 197-198.
45. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, et al. (2001) Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat Genet* 29: 143-152.
- 15 46. Hatton BA, Villavicencio EH, Tsuchiya KD, Pritchard JI, Ditzler S, et al. (2008) The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res* 68: 1768-1776.
47. Fan X, Eberhart CG (2008) Medulloblastoma stem cells. *J Clin Oncol* 26: 2821-2827.
- 20 48. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, et al. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760.
49. Blazek ER, Foutch JL, Maki G (2007) Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67: 1-5.
- 25 50. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, et al. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40: 499-507.
51. Gao JX (2008) Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *J Cell Mol Med* 12: 67-96.
52. Grill J, Dufour C, Kalifa C (2006) High-dose chemotherapy in children with newly-diagnosed medulloblastoma. *Lancet Oncol* 7: 787-789.
- 30 53. Grill J, Sainte-Rose C, Jouvret A, Gentet JC, Lejars O, et al. (2005) Treatment of medulloblastoma with postoperative chemotherapy alone: an SFOP prospective trial in young children. *Lancet Oncol* 6: 573-580.
54. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, et al. (2006) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-114.

Bibliografía de información de soporte

[0104]

1. Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Wikstrand CJ, et al. (1985) Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 592-605.
- 40 2. Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM (1985) Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 472-485.
3. Kim S, Lee UJ, Kim MN, Lee EJ, Kim JY, et al. (2008) MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem* 283: 18158-18166.
- 45 4. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39: 1278-1284.
5. Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, et al. (2003) A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13513-13518.
- 50 6. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, et al. (2006) Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* 66: 7445-7452.
7. Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, et al. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 76: 173-181.
8. Geling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L, Haass C (2002) A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep* 3: 688-694.
- 55 9. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, et al. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40: 499-507.
10. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, et al. (2001) Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat Genet* 29: 143-152.
- 60 11. Gilbertson RJ, Clifford SC (2003) PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* 35: 197-198.
12. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, et al. (2008) MicroRNA profiling in human

medulloblastoma. Int J Cancer 124: 568-577.

13. Gilbertson RJ, Pearson AD, Perry RH, Jaros E, Kelly PJ (1995) Prognostic significance of the c-erbB-2 oncogene product in childhood medulloblastoma. Br J Cancer 71: 473-477.

5 14. Giangaspero F, Wellek S, Masuoka J, Gessi M, Kleihues P, et al. (2006) Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. Acta Neuropathol 112: 5-12.

LISTA DE SECUENCIAS

[0105]

10

<110> Zollo, Massimo

<120> Uso de MicroRNA-199b en el campo médico y de diagnóstico

15

<130> PCT27860

<160> 95

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 110

<212> ADN

<213> artificial

25

<220>

<223> secuencia nucleotídica miR-199b

<400> 1

ccagaggaca cctccactcc gtctaccag tgtttagact atctgttcag gactccaaa 60

30

ttgtacagta gtctgcacat tggtaggct gggctgggtt agaccctcgg 110

<210> 2

<211> 6217

<212> ADN

35

<213> artificial

<220>

<223> secuencia del vector Adv5-CMV-KpnI-NotI pA 6217 pb

40

<400> 2

ES 2 621 824 T3

aattaattaa gctagcatca tcaataatat accttatttt ggattgaagc caatatgata	60
atgagggggt ggagtttgtg acgtggcgcg gggcgtggga acggggcggg tgacgtagta	120
gtgtggcggg agtgtgatgt tgcaagtgtg gcggaacaca tgtaagcgac ggatgtggca	180
aaagtgacgt ttttgggtgtg cgccggtgta cacaggaagt gacaattttc gcgcggtttt	240
aggcggatgt thtagtaaat ttgggcgtaa ccgagtaaga tttggccatt ttcgcgggaa	300
aactgaataa gaggaagtga aatctgaata attttgtgtt actcatagcg cgtaatattt	360
gtctagggag atcagcctgc aggtcgttac ataacttacg gtaaattggcc cgcctggctg	420
accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttcca tagtaacgcc	480
aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacctg cccacttggc	540
agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg	600
gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat	660
ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg	720
tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag	780
tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt	840
gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggctat ataagcagag ctcgtttagt	900
gaaccgtcag atggtaccgt ttaaactcga ggtcgacggt atcgataagc ttgatatcga	960
attcctgcag cccgggggat ccactagttc tagagcggcc gccaccgcg ggagatccag	1020

ES 2 621 824 T3

acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaat	1080
gctttatttg tgaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata	1140
aacaagtaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg	1200
aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtat ggctgattat gatccccgct	1260
gcctcgcgcg tttcggtgat gacggtgaaa acctcttgac acatgcagct cccggagacg	1320
gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg	1380
gggtgtggcg ggtgtcgggg cgcagccatg aggtcgactc tagtccccgc ggtggcagat	1440
ctggaaggtg ctgaggtacg atgagaccgg caccaggtgc agacctgcg agtgtggcgg	1500
taaacatatt aggaaccagc ctgtgatgct ggatgtgacc gaggagctga ggccccgatca	1560
cttggtgctg gcctgcaccc gcgctgagtt tggctctagc gatgaagata cagattgagg	1620
tactgaaatg tgtgggcgtg gcttaagggg gggaaagaat atataaggtg ggggtcttat	1680
gtagttttgt atctgttttg cagcagccgc cgccgcatg agcaccaact cgtttgatgg	1740
aagcatttg agctcatatt tgacaacggc catgccccca tgggccgggg tgcgtcagaa	1800
tgtgatgggc tccagcattg atggtcgccc cgtcctgccc gcaaactcta ctacctgac	1860
ctacgagacc gtgtctggaa cgccgttggg gactgcagcc tccgccgccc cttcagccgc	1920
tgcagccacc gcccgcggga ttgtgactga ctttgcttcc ctgagcccgc ttgcaagcag	1980
tgcagcttcc cgttcatccg cccgcgatga caagttgacg gctcttttgg cacaattgga	2040
ttctttgacc cgggaactta atgtcgttcc tcagcagctg ttggatctgc gccagcaggt	2100
ttctgcccctg aaggcttccct cccctcccaa tgcggtttaa aacataaata aaaaaccaga	2160
ctctgttttg atttggatca agcaagtgtc ttgctgtcct tatttagggg ttttgcgcgc	2220
gcggtaggcc cgggaccagc ggtctcggtc gttgagggtc ctgtgtattt tttccaggac	2280
gtggtaaagg tgactctgga tgttcagata catgggcata agcccgtctc tggggtggag	2340
gtagcaccac tgcaagcatt catgctgcgg ggtggtgttg tagatgatcc agtcgtagca	2400
ggagcgcctg gcgtggtgcc taaaaatgtc tttcagtagc aagctgattg ccaggggcag	2460
gcccttggtg taagtgttta caaagcgggt aagctgggat ggggtcatac gtggggatat	2520
gagatgcatac ttggactgta tttttagggt ggctatgttc ccagccatat ccctccgggg	2580
attcatggtg tgcagaacca ccagcacagt gtatccggtg cacttgggaa atttgtcatg	2640
tagcttagaa ggaaatgctt ggaagaactt ggagacgccc ttgtgacctc caagattttc	2700
catgcattcg tccataatga tggcaatggg cccacgggcg gcggcctggg cgaagatatt	2760
tctgggatca ctaacgtcat agttgtgttc caggatgaga tcgtcatagg ccatttttac	2820
aaagcgcggg cggagggtgc cagactgcgg tataatggtt ccatccggcc caggggcgta	2880
gttaccctca cagatttgca tttcccacgc tttgagttca gatgggggga tcatgtctac	2940
ctgcggggcg atgaagaaaa cggtttccgg ggtaggggag atcagctggg aagaaagcag	3000
gttcctgagc agctgcgact taccgcagcc ggtgggcccg taaatcacac ctattaccgg	3060

ES 2 621 824 T3

gtgcaactgg tagttaagag agctgcagct gccgtcatcc ctgagcaggg gggccacttc 3120
 gttaagcatg tccctgactc gcatgttttc cctgaccaa tccgccagaa ggcgctcgcc 3180
 gccagcgat agcagttctt gcaaggaagc aaagtttttc aacggttga gaccgtccgc 3240
 cgtaggcatg cttttgagcg tttgaccaag cagttccagg cgggtcccaca gctcggtcac 3300
 ctgctctacg gcatctcgat ccagcatatc tcctcgtttc gcgggttggg gcggctttcg 3360
 ctgtacggca gtagtcggtg ctcgtccaga cgggccaggg tcatgtcttt ccacgggagc 3420
 agggctcctg tcagcgtagt ctgggtcacg gtgaaggggt gcgctccggg ctgcgcgctg 3480
 gccaggggtg gcttgaggct ggtcctgctg gtgctgaagc gctgccggtc ttcgccctgc 3540
 gcgtcggcca ggtagcattt gaccatggtg tcatagtcca gccctccgc ggcgtggccc 3600
 ttggcgcgca gcttgccctt ggaggaggcg ccgcacgagg ggcagtgcag acttttgagg 3660
 gcgtagagct tgggcgcgag aaataccgat tccggggagt aggcattccgc gccgcaggcc 3720
 ccgcagacgg tctcgcattc cacgagccag gtgagctctg gccgttcggg gtcaaaaacc 3780
 aggtttcccc catgcttttt gatgcgtttc ttacctctgg tttccatgag ccggtgtcca 3840
 cgctcgggtg cgaaaaggct gtccgtgtcc ccgtatacag acttgagagg cctgtcctcg 3900
 accgatgccc ttgagagcct tcaaccagcag cagctccttc cgggtgggagc ggggcatgac 3960
 tatcgtcgcc gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc 4020
 agcgtctctg gtcattttcg gcgaggaccg ctttcgctgg agcgcgacga tgatcggcct 4080
 gtcgcttgcg gtattcggaa tcttgacgc cctcgtcaa gccttcgtca ctggtcccgc 4140
 caccaaacgt ttcggcgaga agcaggccat tatcgccggc atggcgggcg acgcgctggg 4200
 ctacgtcttg ctggcgttcg cgacgcgagg ctggatggcc ttccccatta tgattcttct 4260
 cgcttccggc ggcattcggga tgcccgcggt gcaggccatg ctgtccaggc aggtagatga 4320
 cgaccatcag ggacagcttc aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgct 4380
 gctggcgctt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 4440
 tcagagggtg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttccc ctggaagctc 4500
 cctcgtgcgc tctcctgctc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc 4560
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg 4620
 cgttcgtccc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccagacc gctgcgcctt 4680
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 4740
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 4800
 gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa 4860
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 4920
 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 4980
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg 5040
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 5100

ES 2 621 824 T3

aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 5160
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact 5220
ccccgctcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 5280
gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 5340
aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 5400
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 5460
tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 5520
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgtttgtc aaaaaagcgg ttagctcctt 5580
cggtcctccg atcgttgca gaagtaagt ggccgcagt ttatcactca tggttatggc 5640
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 5700
gtactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcccga ccgagttgct cttgcccggc 5760
gtcaacacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 5820
acgttctctg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 5880
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 5940
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatgtg 6000
aatactcata ctcttcctt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 6060
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgacatt 6120
tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 6180
aaatagcgt atcacgaggc ctttcgtct tcaagaa 6217

5 <210> 3
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> cebador directo miRNA199b

<400> 3
cggaattcc cagaggacac ctccac 26

15 <210> 4
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> cebador inverso miRNA199b

<400> 4
cggctcgagc cgagggtcta acccag 26

25 <210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> cebador directo miRNA de U6

<400> 5

ES 2 621 824 T3

gaaaagcctt gtttgctt gc 22

5 <210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> cebador inverso U6 miRNA

<400> 6
ggccatgct aatcttct gt 22

15 <210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> cebador directo miRNA199b

<400> 7
aggacacctc cactccgtct ac 22

25 <210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> cebador inverso miRNA199b

<400> 8
gcctaaccaa tgtcagact actg 24

35 <210> 9
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

40 <220>
<223> sonda miRNA199b

45 <400> 9
cagtgtttag actatctgtt caggactccc aaattg 36

50 <210> 10
<211> 110
<212> ARN
<213> artificial

55 <220>
<223> secuencia miR-199b

<400> 10
ccagaggaca ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu aucuguucag gacuccaaa 60
uuguacagua gucugcaçau ugguuaggcu gggcuggguu agaccucgg 110

60 <210> 11
<211> 23
<212> ARN
<213> artificial

ES 2 621 824 T3

<220>
 <223> secuencia miR199b-5p
 5 <400> 11
 cccaguguuu agacuaucug uuc 23

 <210> 12
 <211> 23
 10 <212> ARN
 <213> artificial

 <220>
 <223> CTR desordenado
 15 <400> 12
 gguuguaugc auucccuac uac 23

 <210> 13
 <211> 81
 20 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> secuencia amplificada CD133
 25 <400> 13
 ctatgtggta cagccgcgtg atttcccaga agatactttg agaaaattct tacagaaggc 60
 atatgaatcc aaaattgatt a 81

 <210> 14
 <211> 35
 30 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> secuencia amplificada c-myc
 35 <400> 14
 aggaggaaca agaagatgag gaagaaatcg atgtt 35
 40 <210> 15
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> secuencia amplificada nanog

 <400> 15
 gcaaatgtct tctgctgaga tgcctcacac ggagactgtc tctcctcttc cttcctccat 60
 50 ggatctgctt attcaggaca gc 82

 <210> 16
 <211> 81
 <212> ADN
 55 <213> artificial

 <220>
 <223> secuencia amplificada oct4

ES 2 621 824 T3

	<400> 16	
	actgcagcag atcagccaca tcgccagca gcttgggctc gagaaggatg tgggccgagt	60
	gtggttctgt aaccggcgcc a	81
5	<210> 17 <211> 51 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> secuencia amplificada TCFL1	
	<400> 17	
	ccgcgggact attcgccga agtgagaagg cctcaggaca gcgcgttctt t	51
15	<210> 18 <211> 51 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> secuencia amplificada ZIC1	
	<400> 18	
25	cagttcgctg cgcaaacaca tgaaggcca cgaatcctcc tcgcagggt c	51
30	<210> 19 <211> 55 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> secuencia amplificada KLF5	
35	<400> 19	
	gcattcacta ctgcgattac cctggttgca caaaagtta taccaagtct tctca	55
40	<210> 20 <211> 51 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> secuencia amplificada HMGA1	
45	<400> 20	
	aaaaacaagg gtgctgcca gaccggaaa accaccacaa ctccaggaag g	51
50	<210> 21 <211> 51 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> secuencia amplificada HMGB3	
55	<400> 21	
	tftccaaga agtgctctga gaggtggaag acgatgtccg ggaaagagaa a	51
60	<210> 22 <211> 20 <212> ADN	

<213> artificial
 <220>
 <223> cebador directo CD133
 5
 <400> 22
 ctatgtgga cagccgctg 20
 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 10
 <220>
 <223> cebador inverso CD133
 15
 <400> 23
 taatcaatt tggattcata tgcctc 27
 20
 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 25
 <220>
 <223> cebador directo c-myc
 <400> 24
 atgaggagac accgcccac 19
 30
 <210> 25
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 35
 <220>
 <223> cebador inverso c-myc
 <400> 25
 aacatcgatt tctcctcat ctctt 26
 40
 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 45
 <220>
 <223> cebador directo Nanog
 50
 <400> 26
 gcaaagtct tctgctgaga tgc 23
 <210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 55
 <220>
 <223> cebador inverso Nanog
 60
 <400> 27
 gctgcctga ataagcagat ccat 24

ES 2 621 824 T3

5
<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador directo Oct4

10
<400> 28
actgcagcag atcagccaca 20

<210> 29
<211> 18
<212> ADN
15
<213> artificial

<220>
<223> cebador inverso Oct4

20
<400> 29
tggcgccgggt tacagaac 18

<210> 30
<211> 17
25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador directo TCFL1
30

<400> 30
ccgcgggact atttcgc 17

35
<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
40
<223> cebador inverso TCFL1

<400> 31
aaagaacgcg ctgtcctgag 20

45
<210> 32
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial

50
<220>
<223> cebador directo ZIC1

<400> 32
55
cagttcgctg cgcaaaca 18

<210> 33
<211> 18
<212> ADN
60
<213> artificial

<220>
<223> cebador inverso ZIC1

<400> 33
 gagccctgcg aggaggat 18

 5 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial

 10 <220>
 <223> cebador directo KLF5

 <400> 34
 gcatccacta ctgcgattac cc 22

 15 <210> 35
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> cebador inverso KLF5

 <400> 35
 tgagaagact tggataaac tttgtgc 28

 25 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

 30 <220>
 <223> cebador directo HMGA1

 <400> 36
 aaaaacaagg gtgctgcaa 20

 35 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

 40 <220>
 <223> cebador inverso HMGA1

 45 <400> 37
 ccttcctgga gttgtgtgg t 21

 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial

 50 <220>
 <223> cebador directo HMGB3

 55 <400> 38
 tttccaaga agtgctctga gagg 24

 60 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 621 824 T3

<220>
 <223> cebador inverso HMGB3

5 <400> 39
 tttctcttc ccggacatcg 20

10 <210> 40
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> secuencia amplificada cd133

<400> 40
 tccacagaaa tttacctaca ttggaagagt atgattcata ctggtggctg ggtggcctgg 60
 tcattctgctc tctgctgacc c 81

20 <210> 41
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> artificial

25 <220>
 <223> secuencia amplificada c myc

<400> 41
 gctggatttt tttcgggtag tggaaaacca gcagcctccc gcgacgatgc ccctcaacgt 60
 tagcttcacc aacaggaact a 81

30 <210> 42
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> artificial

35 <220>
 <223> secuencia amplificada nanog

<400> 42
 ccgaagaata gcaatggtgt gacgcagaag gcctcagcac ctacctaccc cagcctttac 60
 tcttcctacc accagggatg 80

40 <210> 43
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> artificial

45 <220>
 <223> secuencia amplificada oct4

50 <400> 43
 aacccggagg aggtagtcct ttgttacatg catgagtcag tgaacagga atgggtgaat 60
 gacatttggtg ggtaggttat t 81

55 <210> 44
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>

ES 2 621 824 T3

	<223> secuencia amplificada tcf1	
	<400> 44	
	ccaaggaaga gaacgttgac atagaaggct ctttgtgttt ttccttgtct tttgtcctca	60
5	gacttgatcc tgctccctcg g	81
	<210> 45	
	<211> 80	
	<212> ADN	
10	<213> artificial	
	<220>	
	<223> secuencia amplificada zic1	
	<400> 45	
	cgcgctccga gaatttaaag atccacaaaa ggacgcacac agggagaagc ctttcaagtg	60
15	cgagtttgag ggctgtgacc	80
	<210> 46	
	<211> 81	
	<212> ADN	
20	<213> artificial	
	<220>	
	<223> secuencia amplificada KLF5	
25	<400> 46	
	tttaacccca cctccatcct atgctgctac aattgcttct aaactggcaa ttcacaatcc	60
	aaatttacc accaccctgc c	81
	<210> 47	
	<211> 77	
30	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> secuencia amplificada HMGA1	
35	<400> 47	
	ccccaggcag accttatatg agacatggga gtcccaccgt attgtccagg ctggctcga	60
	actcctgacc tcaagca	77
	<210> 48	
40	<211> 81	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> secuencia amplificada HMGB3	
	<400> 48	
	cgctatgatc gggaaatgaa ggattatgga ccagctaagg gaggcaagaa gaagaaggat	60
	cctaattgctc ccaaaaggcc a	81
50	<210> 49	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> artificial	

<220>
 <223> cebador directo cd133
 5 <400> 49
 tccacagaaa ttacctaca ttggaa 26
 <210> 50
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador inverso cd133
 15 <400> 50
 gggtcagcag agagcagatg a 21
 <210> 51
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda cd133
 25 <400> 51
 agtatgattc atactggtgg ctgggtggc 29
 30 <210> 52
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> cebador directo c myc
 <400> 52
 40 gctggatttt tttcgggtag tg 22
 <210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> cebador inverso c myc
 <400> 53
 50 tagttcctgt tgggaagct aacg 24
 <210> 54
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> sonda c myc
 60 <400> 54
 cagcagcctc ccgcgacg 18
 <210> 55

<211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> cebador directo nanog
 <400> 55
 ccgaagaata gcaatggtgt ga 22
 10 <210> 56
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> cebador inverso nanog
 <400> 56
 20 gcatccctgg tggtaggaag a 21
 <210> 57
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda nanog
 30 <400> 57
 cagcacctac ctaccccagc ctta 25
 <210> 58
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador directo oct4
 40 <400> 58
 aacccggagg aggtagtct t 21
 <210> 59
 <211> 26
 45 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> cebador inverso oct4
 <400> 59
 aataacctac ccacaaatgt cattca 26
 55 <210> 60
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> sonda oct4
 <400> 60

catgcatgag tcagtgaaca gggaa 25

5 <210> 61
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> cebador directo tcfl1

<400> 61
ccaaggaaga gaacgtgac atag 24

15 <210> 62
<211> 19
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> cebador inverso tcfl1

<400> 62
ccgagggagc aggatcaag 19

25 <210> 63
<211> 32
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> sonda tcfl1

<400> 63
aggctcttg tgttttcct tgcctttgt cc 32

35 <210> 64
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

40 <220>
<223> cebador directo zic1

45 <400> 64
cgcgctccga gaattaaag 20

50 <210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador inverso zic1

55 <400> 65
cggtcacagc cctcaaactc 20

60 <210> 66
<211> 23
<212> ADN
<213> artificial

<220>

<223> sonda zic1
 <400> 66
 5 tccacaaaag gacgcacaca ggg 23
 <210> 67
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador directo KLF5
 <400> 67
 15 ttaacccca cctccatcct atg 23
 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador inverso KLF5
 25 <400> 68
 ggcagggtgg tgggtaaatt 20
 <210> 69
 <211> 26
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda KLF5
 35 <400> 69
 tgcttctaaa ctggcaattc acaatc 26
 <210> 70
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador directo HMGA1
 45 <400> 70
 ccccgagcag accttatatg ag 22
 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador inverso HMGA1
 55 <400> 71
 60 tgcttgaggt caggagtgcg a 21
 <210> 72
 <211> 25
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> sonda HMGA1
 5
 <400> 72
 catgggagtc ccaccgtatt gtcca 25
 <210> 73
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 10
 <220>
 <223> cebador directo HMGB3
 15
 <400> 73
 cgctatgac gggaaatgaa g 21
 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 25
 <220>
 <223> cebador inverso HMGB3
 30
 <400> 74
 tggccttttg ggagcattag 20
 35
 <210> 75
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 40
 <220>
 <223> sonda HMGB3
 45
 <400> 75
 attatggacc agctaagga ggcaag 26
 <210> 76
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> artificial
 50
 <220>
 <223> cebador sentido HES1 3'UTR
 55
 <400> 76
 aaaatctaga cagttcgaag acataaaagc c 31
 <210> 77
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 60
 <220>
 <223> cebador antisentido HES1 3'UTR
 <400> 77
 aaaatctaga aacgcagtgt caccttcc 28

ES 2 621 824 T3

5
<210> 78
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador sentido para la mutagénesis específica del sitio de unión a miR-199b-5p en HES1 3'UTR

10
<400> 78
aacaggaact tgaatattg tagagaagag gacttt 36

<210> 79
<211> 17
<212> ADN
15
<213> artificial

<220>
<223> cebador directo beta actina

20
<400> 79
cgtgctgctg accgagg 17

<210> 80
<211> 24
25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador inverso beta actina

30
<400> 80
gaaggtctca aacatgatct gggt 24

<210> 81
<211> 18
35
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador directo beta actina

40
<400> 81
gccaaccgcg agaagatg 18

45
<210> 82
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

50
<220>
<223> cebador inverso beta actina

55
<400> 82
acagcctgga tagcaacgta ca 22

<210> 83
<211> 25
60
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> sonda beta actina

<400> 83
 cccaatcatg ttgagacct tcaac 25

 5 <210> 84
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial

 10 <220>
 <223> cebador sentido PDGFR-B

 <400> 84
 aggttgctga cgagggcc 18

 15 <210> 85
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> cebador antisentido PDGFR-B

 <400> 85
 ggtgttgact tcattcaggg tg 22

 25 <210> 86
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

 30 <220>
 <223> cebador sentido PDGFR-A

 <400> 86
 tcaaggcaga aataggcagc a 21

 35 <210> 87
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial

 40 <220>
 <223> cebador antisentido PDGFR-A

 45 <400> 87
 tggacgtcga tcaggtcca 19

 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

 50 <220>
 <223> cebador sentido SPARC

 55 <400> 88
 ttgctggac tctgagctga 20

 60 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador antisentido SPARC

 <400> 89
 5 gggtgaccag gacgttcttg 20

 <210> 90
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador sentido ILF3

 <400> 90
 15 ccgacacgcc aagtggtt 18

 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador antisentido ILF3

 <400> 91
 25 acacaagact tcagcccgtt g 21

 <210> 92
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador sentido MYBL2

 <400> 92
 35 agcaagtgca aggtcaaatg g 21

 <210> 93
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador antisentido MYBL2

 <400> 93
 50 ggccctcagc tgctcgt 17

 <210> 94
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> cebador sentido TEAD4

 <400> 94
 60 tcggacgagg agggcaagat g 21

 <210> 95
 <211> 20

<212> ADN
<213> artificial

5

<220>
<223> cebador antisentido TEAD4

<400> 95
gatgtagcgg gcaatcagct 20

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido que tiene una secuencia que comprende o que consiste en la siguiente secuencia:

CCAGAGGACACCTCCACTCCGTCTACCCAGTGTTTAGACTATCTGTTCA
 GGA CTCCCAAATTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGCTGGGCTG
 5 GGT TAGACCCTCGG (SEQ ID NO: 1)

o que comprende o que consiste en la secuencia ribonucleotídica correspondiente:

CCAGAGGACACCUCCACUCCGUCUACCCAGUGUUUAGACUAUCUG
 UUCAGGACUCCCAAUUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGGCU
 10 GGGCUGGGUUAGACCCUCGG (SEQ ID NO: 10)

o que comprende o que consiste en una parte de la SEQ ID No: 10:

CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC (SEQ ID NO:11)

15 para su uso en el tratamiento y/o prevención de tumores **caracterizado por** la expresión del gen CD133, escogido en el grupo que consiste en meduloblastoma, linfoma, glioblastoma, carcinoma de colon y carcinoma mamario.

2. Oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, portado por un vector vírico o a través de tecnología SNALP, tecnología LNA, o que tiene el grupo O-2-metilo modificado por la unión de una molécula de colesterol única a través de un enlazador C₁₋₇.

3. Oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el vector vírico es un vector adenovírico.

4. Oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el vector adenovírico es un vector AdV5 que tiene la secuencia de mapa genómico mostrada en la figura 16, consistiendo dicho vector en 6217 pb con un promotor de CMV, en el que la secuencia que consiste en o que comprende la SEQ ID NO:1 se ha clonado en los sitios de restricción XhoI/HindIII.

5. Un método de diagnóstico *in vitro* para evaluar el estadio histopatológico de un tumor y la presencia de metástasis por la detección, en una muestra biológica, de la expresión de la secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO:1, y en uno o más genes expresados en las células madre de cáncer escogidas entre CD133, c-myc, nanog, oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3, estando dicho tumor escogido del grupo que consiste en meduloblastoma, linfoma, glioblastoma, carcinoma de colon, y carcinoma mamario.

6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la detección de la expresión de la secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO:1 se hace por PCR en tiempo real usando los siguientes cebadores de amplificación:

40 cebador directo: CGGGAATCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)
 cebador inverso: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

y un par de cebadores de control que se usarán para normalizar el valor de expresión de la secuencia.

7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los cebadores de control que se usarán para normalizar el valor de expresión de la secuencia son los siguientes:

45 cebador directo: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)
 cebador inverso: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

8. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la detección de la expresión de la secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO:1 comprende las siguientes etapas:

a) retrotranscripción del ARN; y b) expresión de dicha secuencia por ensayo TaqMan usando las siguientes

ES 2 621 824 T3

secuencias de cebadores y de sonda:

5 cebador directo: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)
 cebador inverso: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)
 sonda: CAGTGTTTAGACTATCTGTTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 5 a 8, en el que dicho uno o más genes se detectan por PCR en tiempo real por amplificación de al menos una de las siguientes secuencias:

10 CD133:

 CTATGTGGTACAGCCGCGTGATTTCCCAGAAGATACTTTGAGAAAATT
 CTTACAGAAGGCATATGAATCCAA AATTGATTA (SEQ ID NO: 13)

15 c-myc:

 AGGAGGAACAAGAAGATGAGGAAGAAATCGATGTT (SEQ ID NO: 14)

Nanog:

 GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGCCTCACACGGAGACTGTCTCTCCTC
20 TTCCTTCTCCATGGATCTGCTTATTCAGGACAGC (SEQ ID NO: 15)

Oct4:

 ACTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCCAGCAGCTTGGGCTCGAGAAG G
25 ATGTGGTCCGAGTGTGGTTCTGTAACCGGCGCCA (SEQ ID NO: 16)

TCFL1:

 CCGCGGGACTATTTGCGCGAAGTGAGAAGGCCTCAGGACAGCGCGT TCTTT (SEQ ID NO: 17)

30 ZIC1:

 CAGTTCGCTGCGCAAACACATGAAGGTCCACGAATCCTCCTCGCAGG GCTC (SEQ ID NO:18)

KLF5:

35 GCATCCACTACTGCGATTACCCTGGTTGCACAAAAGTTTATACCAAGT
 CTTCTCA (SEQ ID NO: 19)

HMGA1:

40 AAAACAAGGGTGCTGCCAAGACCCGAAAACCACCACAACCTCCAG GAAGG (SEQ ID NO:20)

HMGB3:

45 TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGGTGGAAGACGATGTCCGGGAAAGA GAAA (SEQ ID NO:21);

usando los siguientes pares de cebadores de amplificación:

CD133:

50 Cebador directo: CTATGTGGTACAGCCGCGTG (SEQ ID NO:22)
 Cebador inverso: TAATCAATTTTGGATTCATATGCCTTC (SEQ ID NO:23)

c-myc

ES 2 621 824 T3

cebador directo: ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)
cebador inverso: AACATCGATTTCTTCCTCATCTTCTT (SEQ ID NO:25)

5 Nanog:

cebador directo: GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGC (SEQ ID NO:26)
cebador inverso: GCTGTCCTGAATAAGCAGATCCAT (SEQ ID NO:27)

10 Oct4:

cebador directo: ACTGCAGCAGATCAGCCACA (SEQ ID NO:28)
cebador inverso: TGGCGCCGGTTACAGAAC (SEQ ID NO:29)

15 TCFL1:

cebador directo: CCGCGGGACTATTTTCGC (SEQ ID NO:30)
cebador inverso: AAAGAACGCGCTGTCTGAG (SEQ ID NO:31)

20 ZIC1:

cebador directo: CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)
cebador inverso: GAGCCCTGCGAGGAGGAT (SEQ ID NO:33)

25 KLF5:

cebador directo: GCATCCACTACTGCGATTACCC (SEQ ID NO:34)
cebador inverso: TGAGAAGACTTGGTATAAACTTTTGTGC (SEQ ID NO:35)

30 HMGA1:

cebador directo: AAAAACAAGGGTGCTGCCAA (SEQ ID NO:36)
cebador inverso: CCTTCTGGAGTTGTGGTGGT (SEQ ID NO:37)

35 HMGB3:

cebador directo: TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGG (SEQ ID NO:38)
cebador inverso: TTTCTCTTTCCCGGACATCG (SEQ ID NO:39)

40 y usando los siguientes pares de cebadores que se usarán para normalizar la expresión de las secuencias génicas:

cebador directo: CGT GCT GCT GAC CGA GG (SEQ ID NO:79)
cebador inverso: GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT (SEQ ID NO:80)

45 **10.** Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que dicho uno o más genes se detectan por ensayo TaqMan en tiempo real por amplificación de al menos una de las siguientes secuencias:

cd133

TCCACAGAAATTTACCTACATT

50 GGAAGAGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGCCTGGTCATCTGCT
CTCTGCTGACCC (SEQ ID NO:40)

c myc

ES 2 621 824 T3

GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTGGAAAACCAGCAGCCT

CCCGCGACGATGCCCTCAACGTTAGCTTCACCAACAGGAACTA (SEQ ID

NO:41)

nanog:

CCGAAGAATAGCAATGGTGTGACGCAG

AAGGCCTCAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTACTCTTCCTACCACCA

5 GGGATG (SEQ ID NO:42)

oct4:

AACCCGGAGGAGGTAGTCCTTTGTTACATGCATGAGTCAGTGAACAG

10 GGAATGGGTGAATGACATTTGTGGGTAGGTTATT (SEQ ID NO:43)

tcfl1:

CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAGAAGGCTCTTTGTGTTTTTCTTGT

CTTTTGTCTCAGACTTGATCCTGCTCCCTCGG (SEQ ID NO:44)

15 zic 1:

CGCGCTCCGAGAATTTAAAGATCCACAAAAGGACGCACACAGGGAGA

AGCCCTTCAAGTCCGAGTTTGAGGGCTGTGACC (SEQ ID NO:45)

20 KLF5:

TTTAACCCACCTCCATCCTATGCTGCTACAATTGCTTCTAAACTGGC

AATTCACAATCCAAATTTACCCACCACCCTGCC (SEQ ID NO:46)

HMGA1:

CCCCAGGCAGACCTTATATGAGACATGGGAGTCCCACCGTATTGTCC

25 AGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGCA (SEQ ID NO:47)

HMGB3:

CGCTATGATCGGGAATGAAGGATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAA

30 GAAGAAGAAGGATCCTAATGCTCCCAAAGGCCA (SEQ ID NO:48);

usando los siguientes cebadores y sondas para la amplificación:

cd 133

35 cebador directo: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)

cebador inverso: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)

sonda: AGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

ES 2 621 824 T3

c myc:

5 cebador directo: GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)
cebador inverso: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)
sonda: CAGCAGCCTCCCGCAGC (SEQ ID NO:54)

nanog:

10 cebador directo: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)
cebador inverso: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)
sonda: CAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

15 cebador directo: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)
cebador inverso: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)
sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

tcfl1:

20 cebador directo: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)
cebador inverso: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)
sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

zic 1:

25 cebador directo: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)
cebador inverso: CGGTCACAGCCCTCAAATC (SEQ ID NO:65)
sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

KLF5:

35 Cebador directo: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)
Cebador inverso: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)
sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

40 Cebador directo: CCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)
Cebador inverso: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCTGA (SEQ ID NO:71)
sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

45 cebador directo: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)
cebador inverso: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)
sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

50 y usando el siguiente par de cebador y sonda para normalizar la expresión de las secuencias génicas:

cebador directo: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO: 81)
cebador inverso: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO: 82)
sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO: 83)

55 **11.** Kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar el estadio histopatológico del tumor, estando dicho tumor escogido del grupo que consiste en meduloblastoma, linfoma, glioblastoma, carcinoma de colon, y carcinoma mamario, y la presencia de las metástasis, mediante la detección de la expresión de la secuencia que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:1, en una muestra biológica, por PCR en tiempo real y la detección de uno o más genes expresados en las células madre de cáncer escogidas entre CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3, comprendiendo o consistiendo dicho kit en:

a) los siguientes cebadores de amplificación de dicha secuencia que comprende o que consiste en SEQ ID NO:1:

ES 2 621 824 T3

cebador directo: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)
cebador inverso: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

- 5 b) un par de cebadores de control para normalizar el valor de expresión de dicha secuencia;
c) los siguientes uno o más pares de cebadores y sondas para detectar las secuencias de dicho uno o más genes:

cd 133

10

cebador directo: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)
cebador inverso: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)
sonda: AGTATGATTCTACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

15 c myc:

cebador directo: GCTGGATTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)
cebador inverso: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)
sonda: CAGCAGCCTCCCAGCAGC (SEQ ID NO:54)

20

nanog:

cebador directo: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)
cebador inverso: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)
sonda: CAGCACCTACCTACCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

25

oct 4:

cebador directo: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)
cebador inverso: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO: 59)
sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

30

tcf1 1:

cebador directo: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)
cebador inverso: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)
sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

35

zic 1:

cebador directo: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)
cebador inverso: CGGTCACAGCCCTCAAATC (SEQ ID NO:65)
sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

40

45 KLF5:

Cebador directo: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)
Cebador inverso: GGCAGGGTGGTGGTAAATT (SEQ ID NO:68)
sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

50

HMGA1:

Cebador directo: CCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)
Cebador inverso: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCTGA (SEQ ID NO:71)
sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

55

HMGB3:

cebador directo: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)
cebador inverso: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)
sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

60

- d) los siguientes cebadores y sondas para normalizar la expresión de dichas secuencias génicas:

cebador directo: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO: 81)
 cebador inverso: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO: 82)
 sonda: CCCAATCATGTTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO: 83)

5 **12.** Kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dichos cebadores de control en b) para normalizar la expresión de la secuencia son los siguientes:

cebador directo: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)
 cebador inverso: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

10 **13.** Kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar el estadio histopatológico del tumor, estando dicho tumor escogido del grupo que consiste en meduloblastoma, linfoma, glioblastoma, carcinoma de colon, y carcinoma mamario, y la presencia de metástasis, mediante la detección, en una muestra biológica, usando PCR en tiempo real Taqman, de la expresión de la secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO:1 y la detección de uno o más genes expresados en las células madre de cáncer escogidas entre CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3, comprendiendo o consistiendo dicho kit en:

15 a1) los siguientes cebadores y la sonda para la detección de la expresión de dicha secuencia que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 1:

cebador directo: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)
 cebador inverso: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)
 sonda: CAGTGTTTAGACTATCTGTTCCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

20 b1) los siguientes uno o más pares de cebadores y sondas relacionadas para detectar la expresión de dicha una o más secuencias génicas:

cd 133

30 cebador directo: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)
 cebador inverso: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)
 sonda: AGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

c myc:

35 cebador directo: GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)
 cebador inverso: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)
 sonda: CAGCAGCCTCCC GCGACG (SEQ ID NO:54)

nanog:

40 cebador directo: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)
 cebador inverso: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)
 sonda: CAGCACCTACCTACCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

45 cebador directo: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)
 cebador inverso: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)
 sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

tcfl1:

50 cebador directo: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)
 cebador inverso: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)
 sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

zic 1:

60 cebador directo: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)
 cebador inverso: CGGTCACAGCCCTCAAATC (SEQ ID NO:65)
 sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

ES 2 621 824 T3

KLF5:

5 Cebador directo: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)
 Cebador inverso: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)
 sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

10 Cebador directo: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)
 Cebador inverso: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCTGA (SEQ ID NO:71)
 sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

15 cebador directo: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)
 cebador inverso: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)
 sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

20 c1) los siguientes pares de cebadores y sonda para normalizar la expresión de dichas secuencias génicas:

 cebador directo: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO: 81)
 cebador inverso: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO: 81)
 sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO: 83)

25

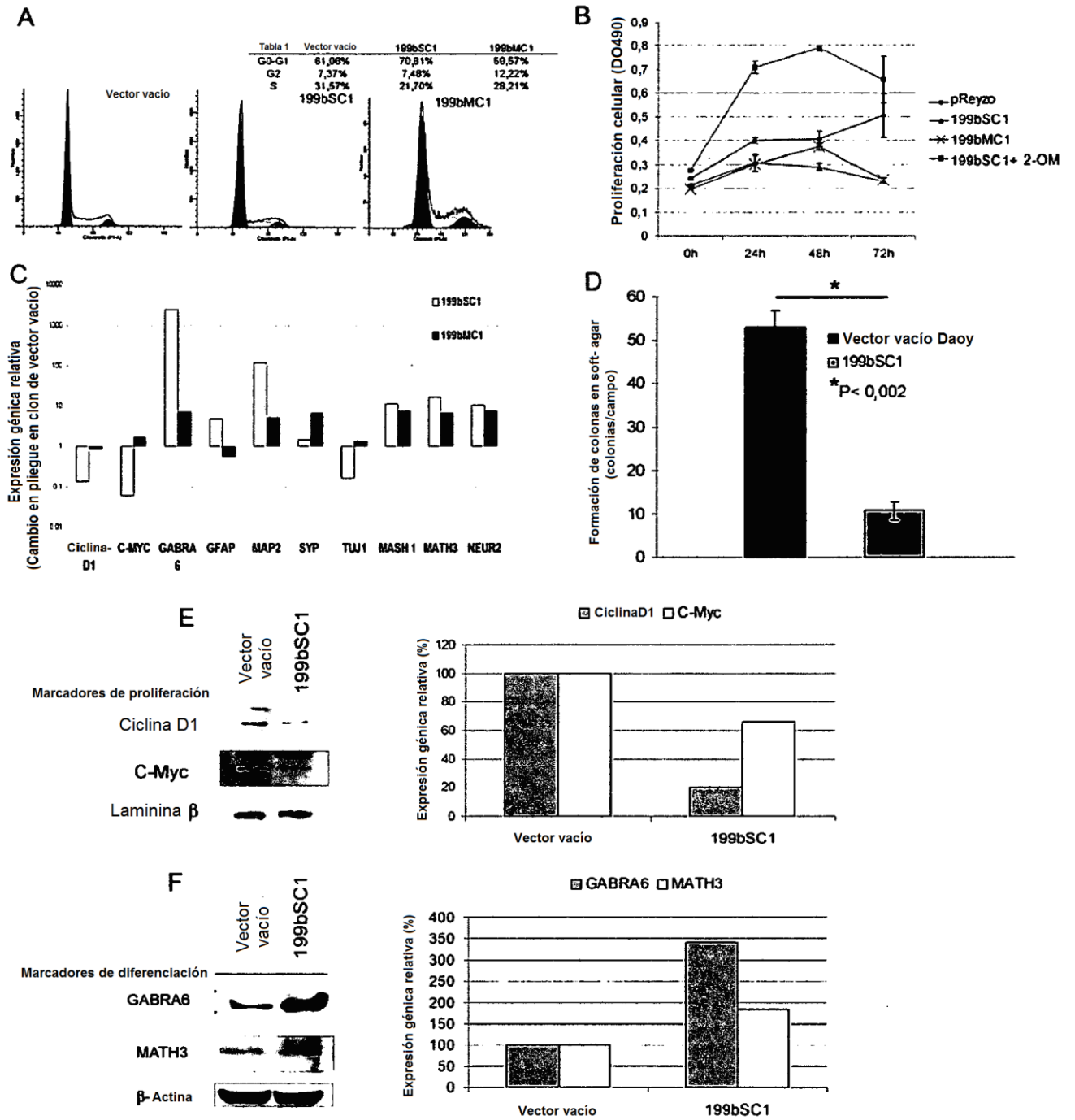


Fig. 1

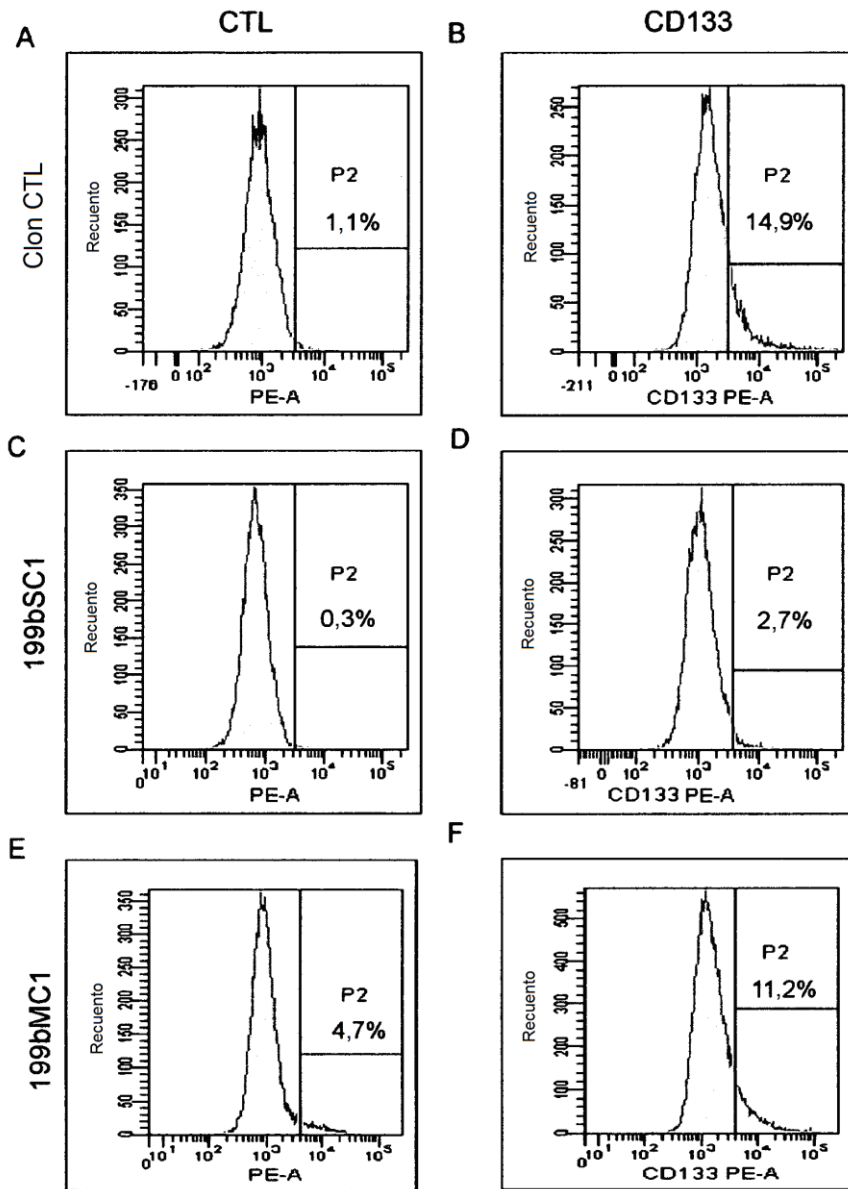


Fig. 2

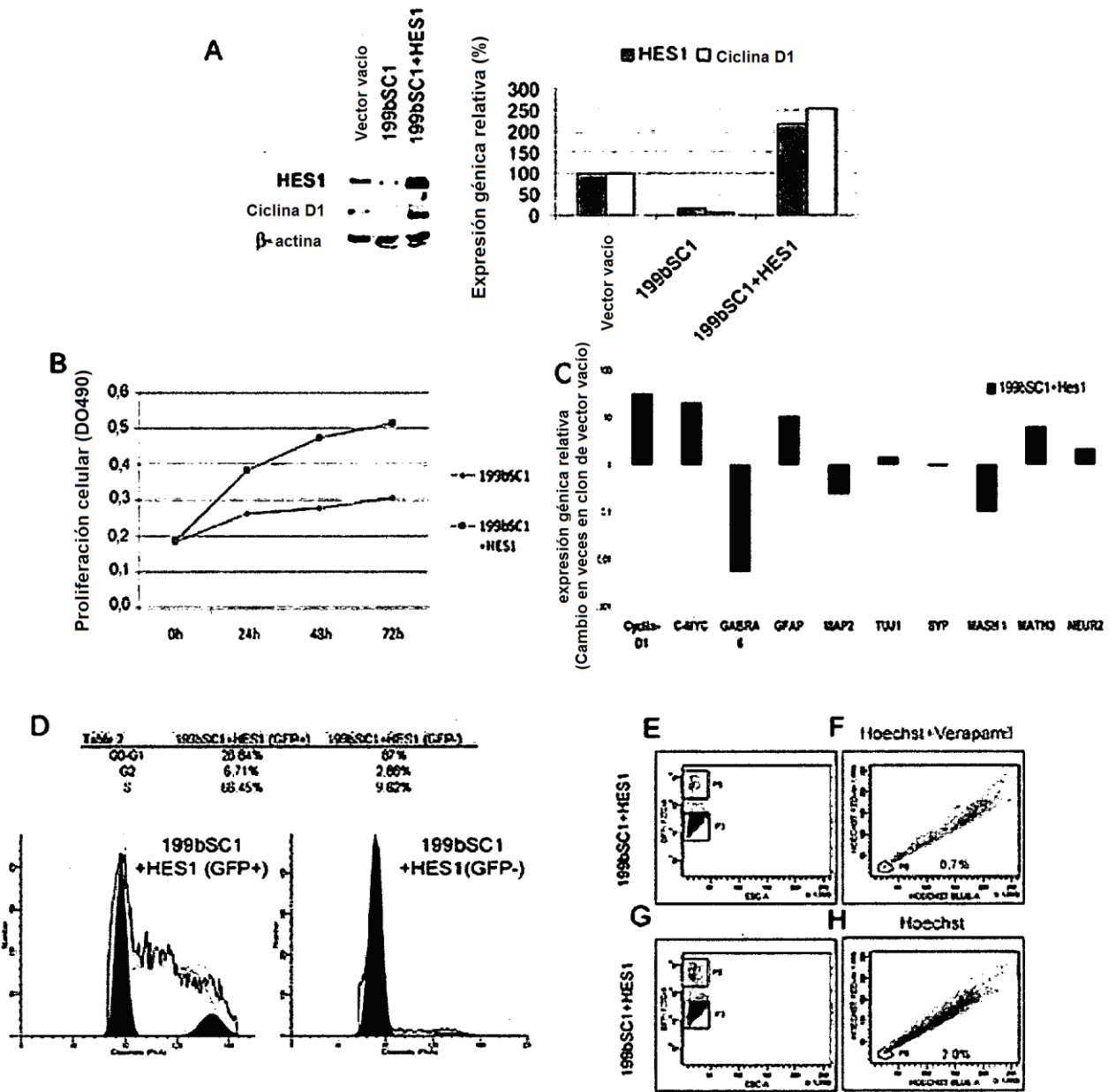


Fig. 3

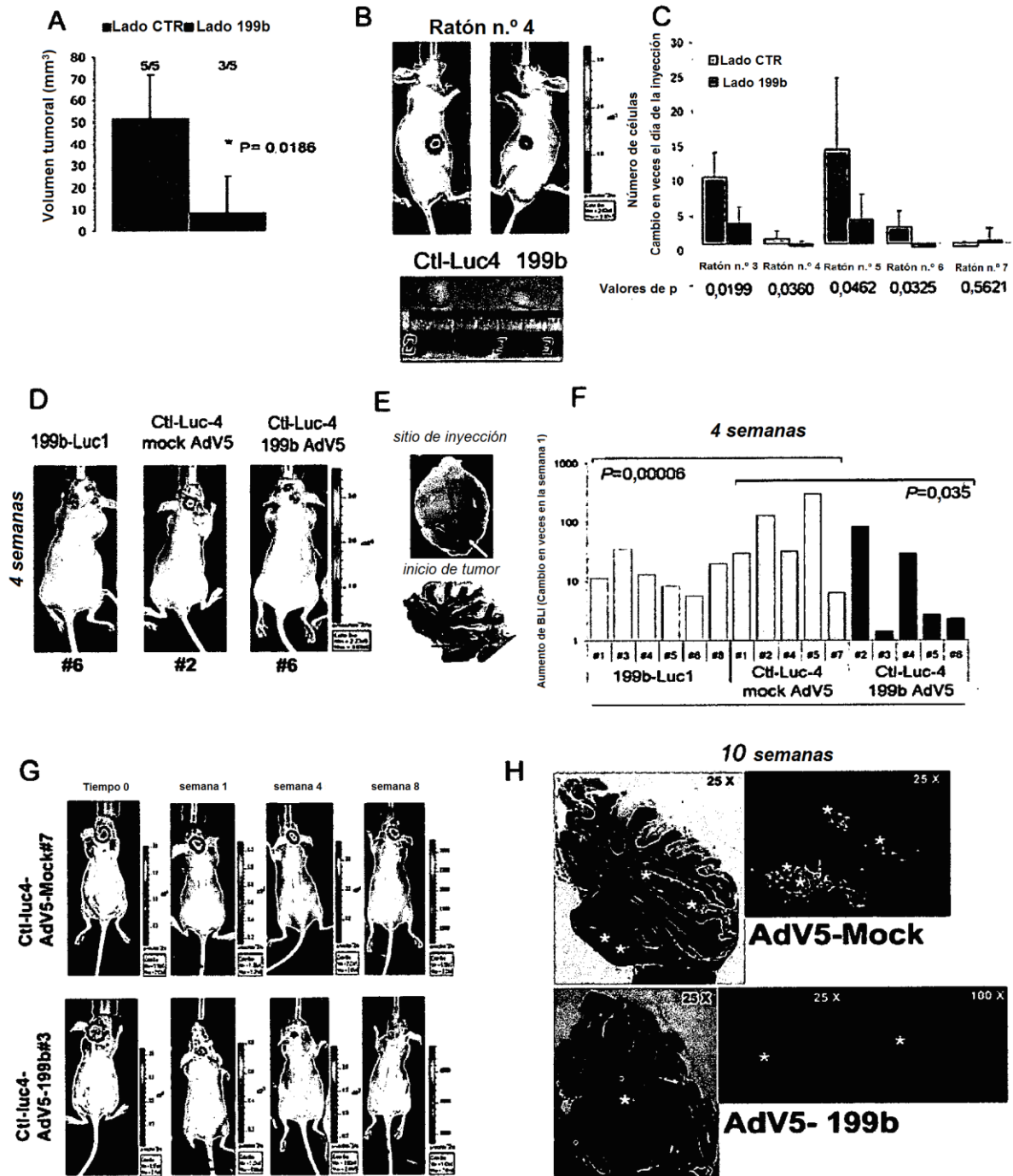


Fig. 4



Ratones PET-TC	Tamaño cm ³	SUV máx	SUV medio
AdV5-Mock # 7	0,0440	2,43	1,6
AdV5-199b # 5	0,0249	1,04	0,7

Fig. 5

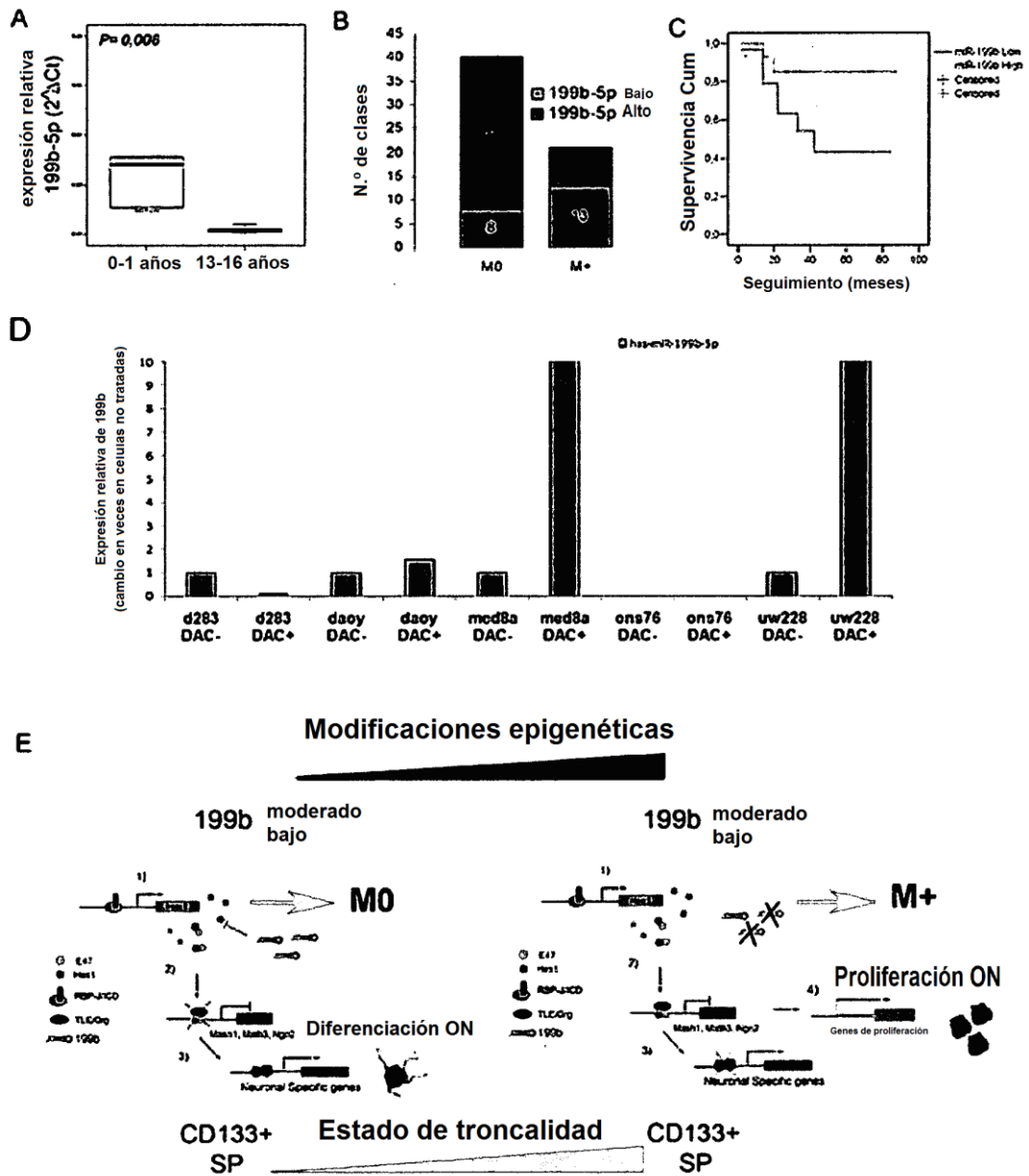


Fig. 6

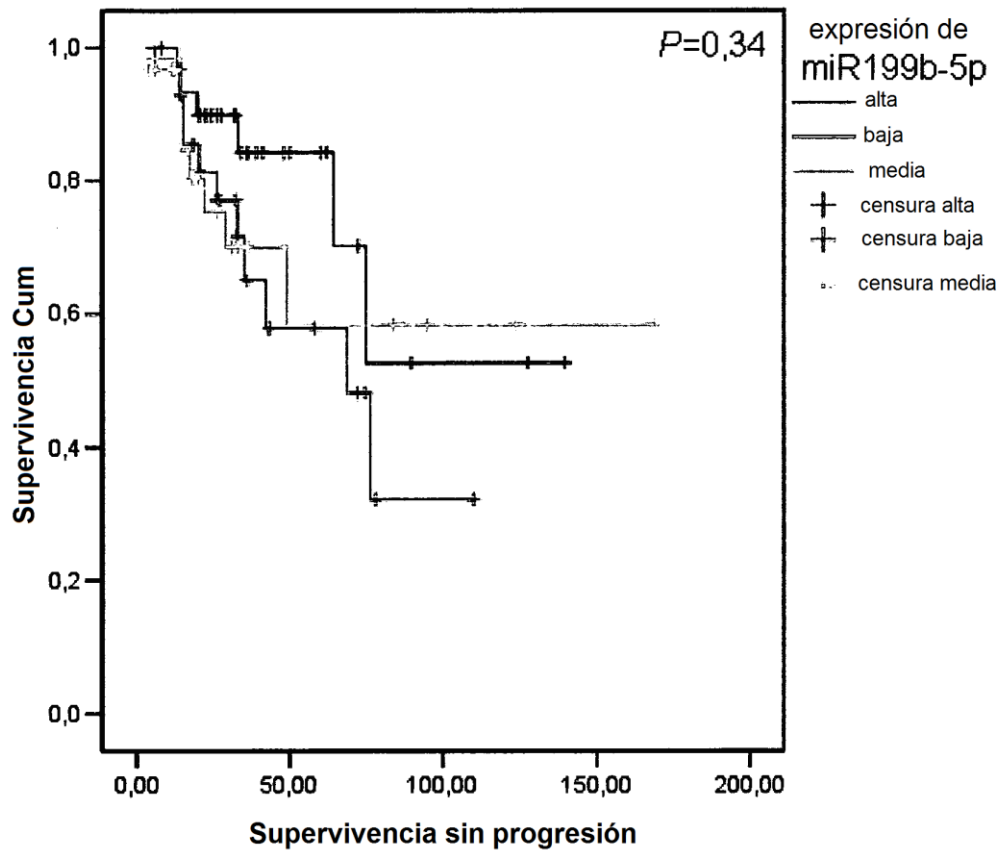


Fig. 7

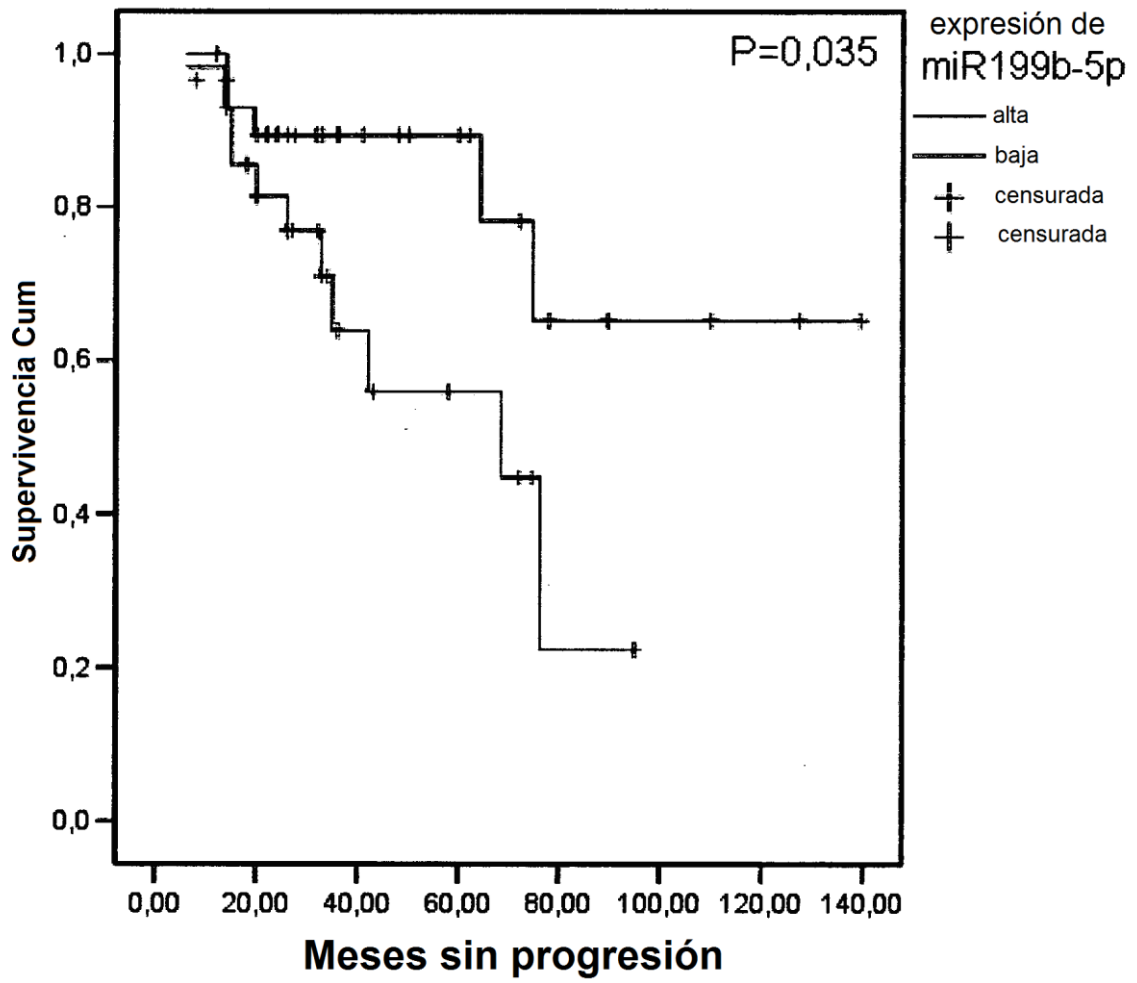


Fig. 8

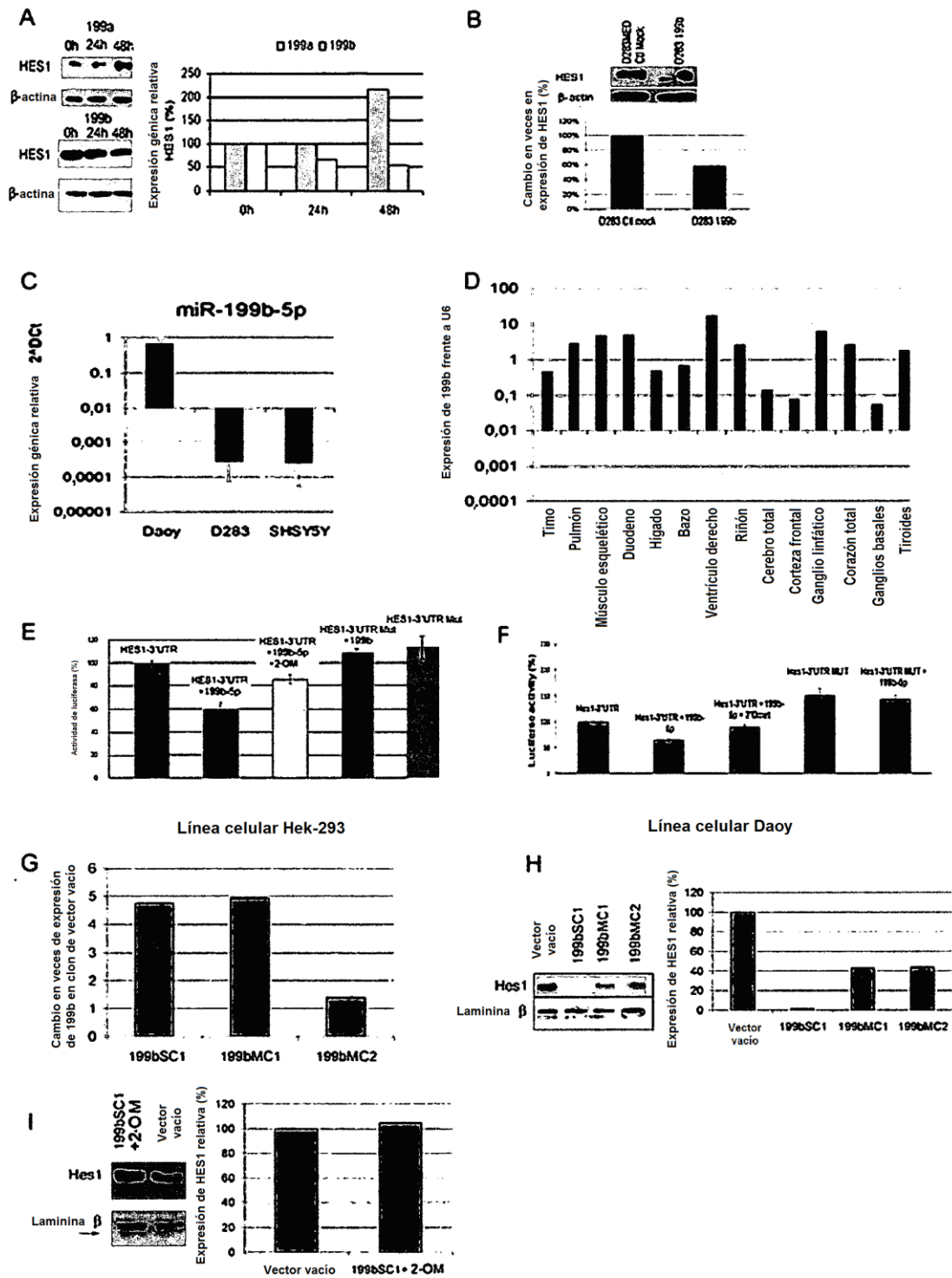


Fig. 9

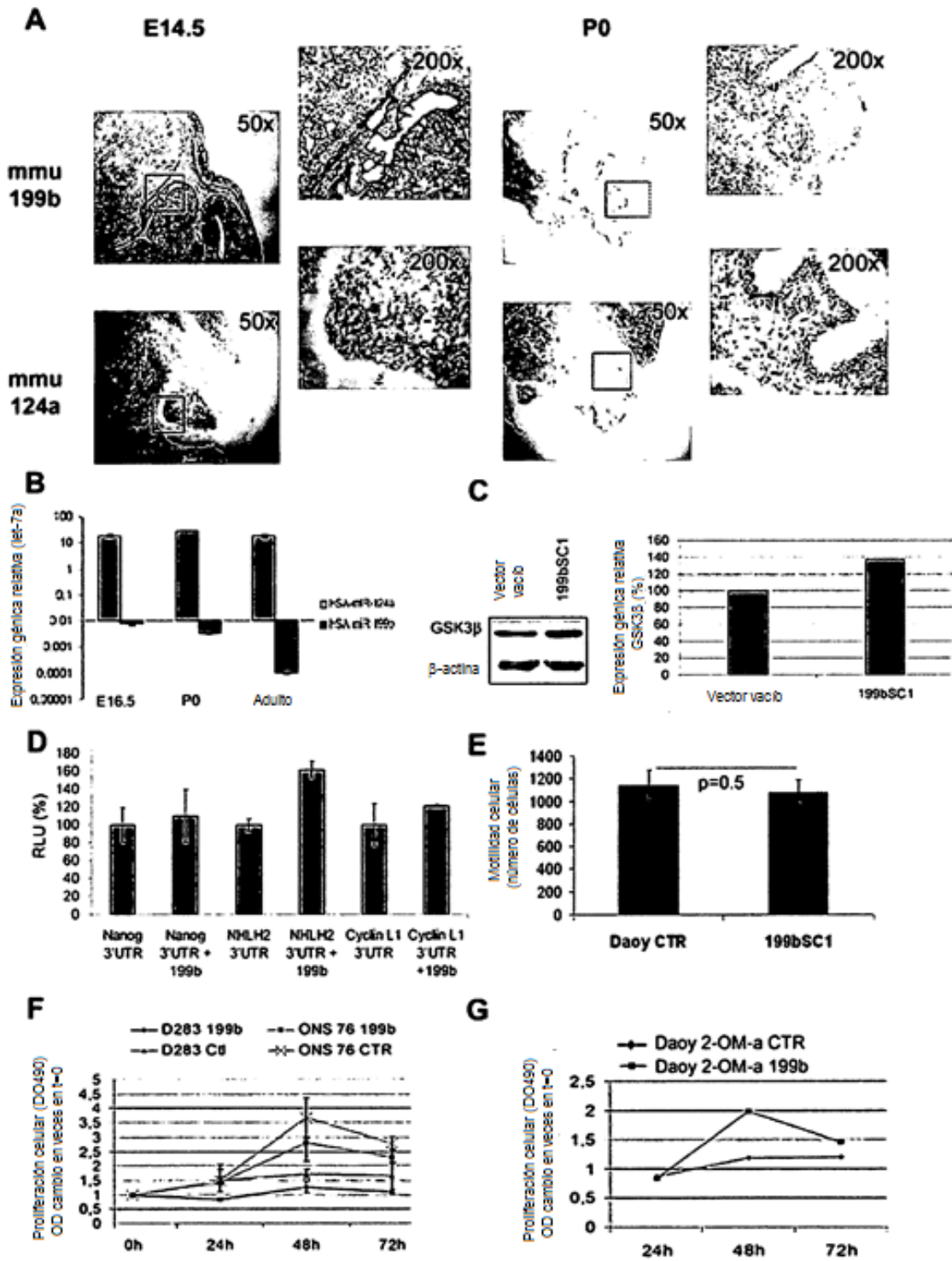


Fig. 10

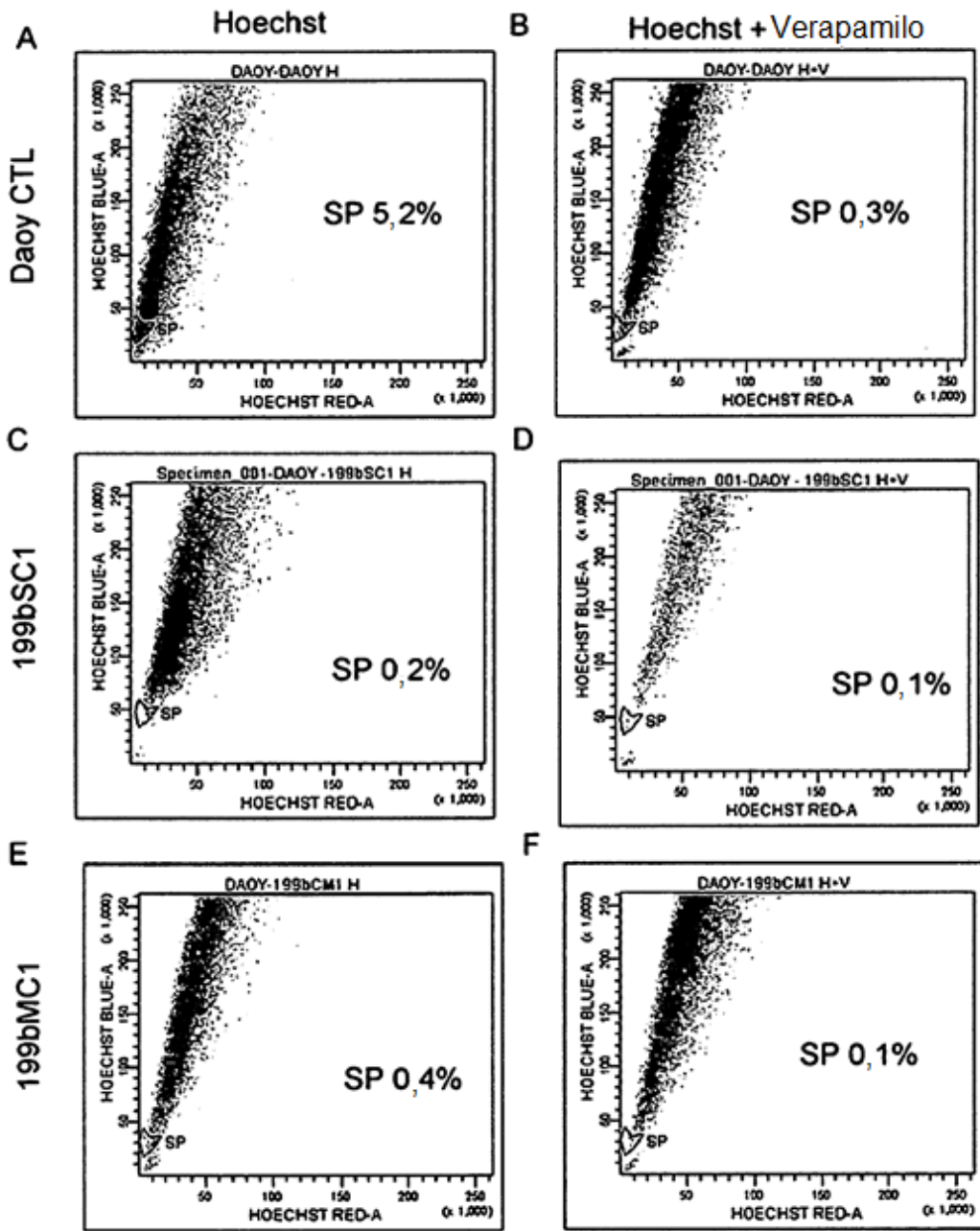


Fig. 11

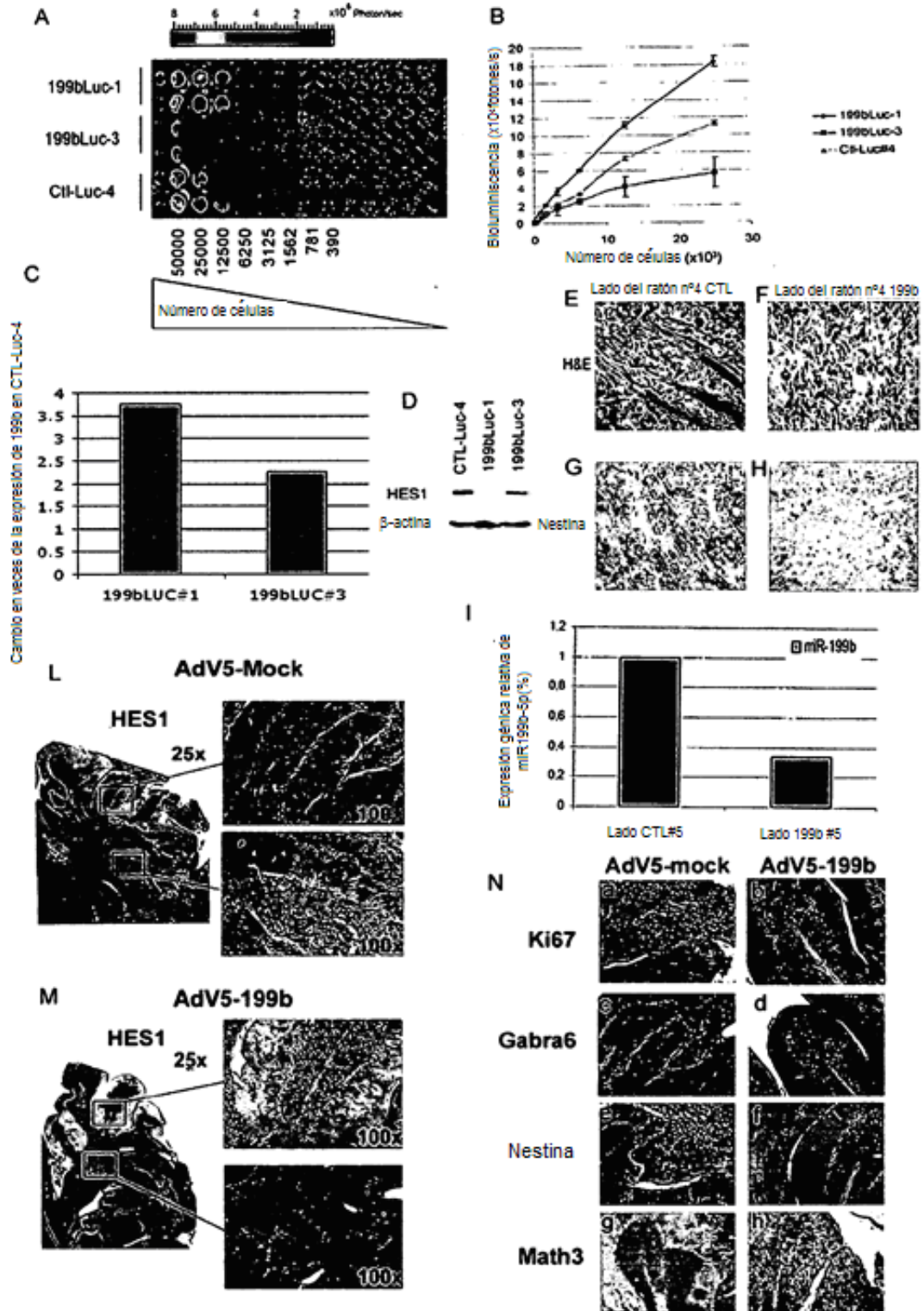


Fig. 12

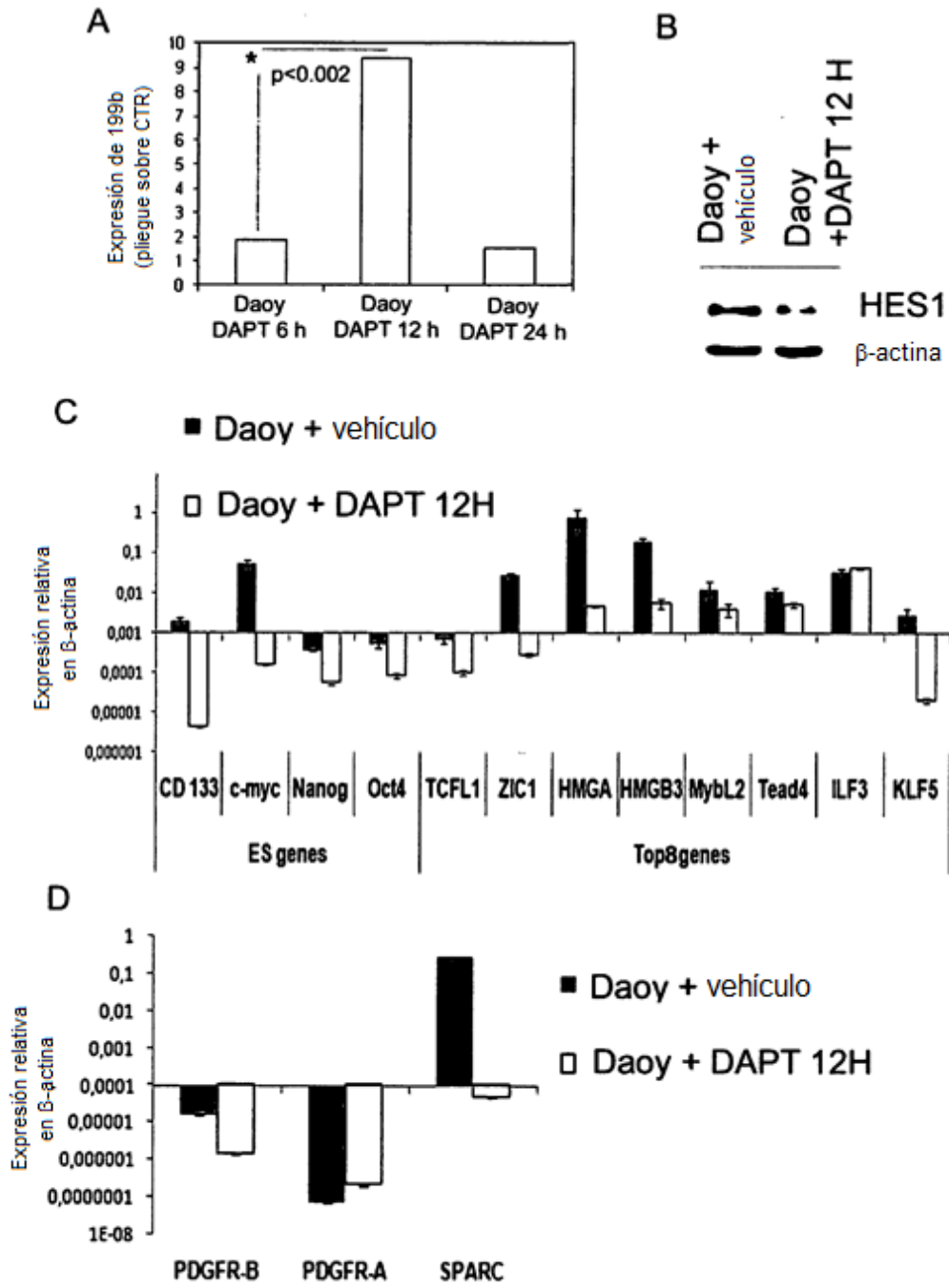
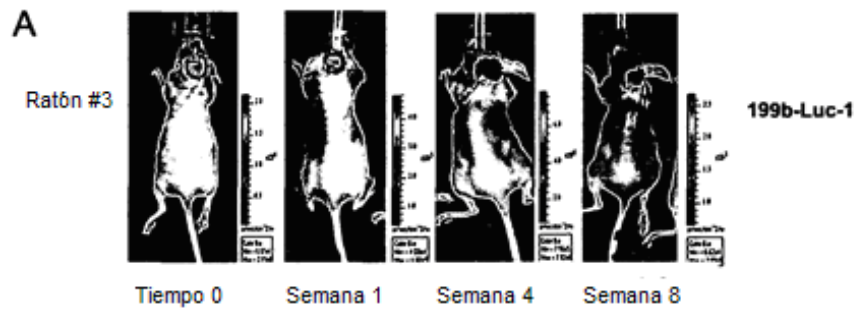


Fig. 13



B

Medición de BLI (p/sec/cm ² /sr)	Tiempo 0	Semana 1	Semana 4	Semana 8
CB-Luc-4 MOCK Adv5 Ratón #7	4,67 x 10 ⁶	1,64 x 10 ⁶	1,06 x 10 ⁷	2,59 x 10 ⁶
CB-Luc-4 199b Adv5 Ratón #3	3,13 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	7 x 10 ⁴
199b Luc-1 Ratón #3	3,42 x 10 ⁶	5,33 x 10 ⁴	1,87 x 10 ⁶	2,27 x 10 ⁶

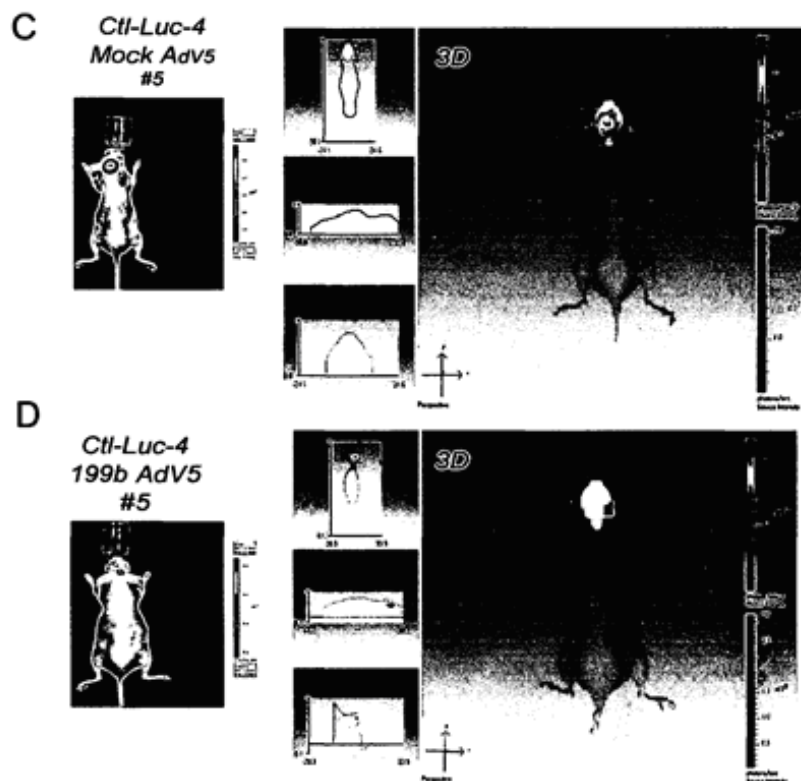


Fig. 14

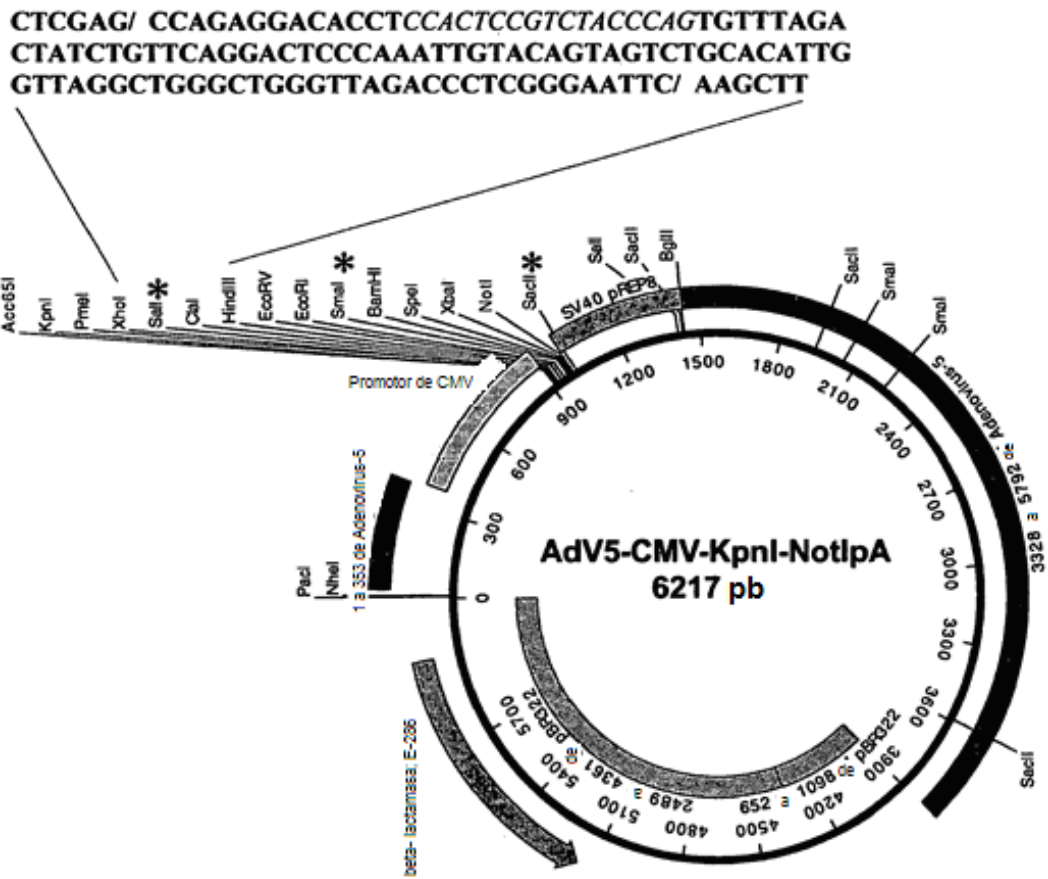


Fig.15

Ad5- CMV- KpnI - NotI pA 6217 PB

```

misc_feature 1..26
              /note="PacI restriction site TTAATTA*"
misc_feature 11..16
              /note="NheI site GCTAGC*"
frag <27..>365
      /note="1 to 353 of Adenovirus-5*"
misc_feature 913..1002
              /note="Multiple cloning site KpnI to NotI*"
misc_feature 1437..1442
              /note="BglII restriction site AGATCT*"
polyA_signal 995..1442
              /note="SV40 pREP8*"
frag <1443..>3897
      /note="3328 to 5792 of Adenovirus-5*"
frag 3898..4344
      /note="652 to 1098 of pBR322*"
frag 4345..6217
      /note="2489 to 4361 of pBR322*"
CDS complement(5149..6009)
      /note="beta-lactamase; E-286*"
promoter 374..912
          /note="CMV promoter*"
    
```

Sitio de cebador Inv. polIA subrayado

RECUESTO BASES 1391 A 1543 C 1732 G 1550 T 1 OTRO
ORIGEN

```

1 AATTAATTA GCTAGCATCA TCAATAATAT ACCTTATTTT GGATTGAAGC CAATATGATA
61 ATGAGGGGGT GGAGTTTGTG ACGTGGCGCG GGGCGTGGGA ACGGGGCGGG TGACGTAGTA
121 GTGTGGCGGA AGTGTGATGT TGCAAGTGTG GCGGAACACA TGTAAAGCGAC GGATGTGGCA
181 AAAGTGACGT TTTTGGTGTG CGCCGGTGTG CACAGGAAGT GACAATTTTC GCGCGGTTTT
241 AGGCGGATGT TGTAGTAAAT TTGGGCGTAA CCGAGTAAGA TTTGGCCATT TTCGCGGGAA
301 AACTGAATAA GAGGAAGTGA AATCTGAATA ATTTTGTGTT ACTCATAGCG CGTAATATTT
361 GTCTAGGGAG ATCAGCCTGC AGGTGTTAC ATAACTTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG
421 ACCGCCAAC GACCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA TAGTAACGCC
481 AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA CCGTAAACTG CCCACTTGGC
541 AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAATG
601 GCCCGCCTGG CATTATGCCC AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT
661 CTACGTATTA GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG
721 TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG TCAATGGGAG
781 TTTGTTTTGG CACCAAATC AACGGGACTT TCCAAATGT CGTAACAAC CCGCCCCATT
841 GACGCAAATG GGCAGTGGC GTGTACGGTG GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCGTTTAGT
901 GAACCGTCAG ATGGTACCGT TTAACCTCGA GGTGACGGT ATCGATAAGC TTGATATCGA
961 ATTCCTGCAG CCCGGGGGAT CCACTAGTTC TAGAGCGGCC GCCACCGCGG GGAGATCCAG
1021 ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAATAAAT
1081 GCTTTATTTG TGAATTTGT GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTATA AGCTGCAATA
1141 AACAAAGTAA CAACAACAAT TGCATTATT TATGTTTCA GGTTCAGGGG GAGGTGTGGG
1201 AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT GATCCCGGCT
1261 GCCTCGCGCG TTTGCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTTTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG
1321 GTCACAGCTT GTCTGAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTGAGGG CGCGTCAGCG
    
```

Fig. 16a

1381 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG AGGTCGACTC TAGTCCCCGC GGTGGCAGAT
 1441 CTGGAAGGTG CTGAGGTACG ATGAGACCCG CACCAGGTGC AGACCCTGCG AGTGTGGCGG
 1501 TAAACATATT AGGAACCAGC CTGTGATGCT GGATGTGACC GAGGAGCTGA GGCCCGATCA
 1561 CTTGGTGCTG GCCTGCACCC GCGCTGAGTT TGGCTCTAGC GATGAAGATA CAGATTGAGG
 1621 TACTGAAATG TGTGGGCGTG GCTTAAGGGT GGGAAAAGAAT ATATAAGGTG GGGGTCTTAT
 1681 GTAGTTTTGT ATCTGTTTTG CAGCAGCCGC CGCCGCCATG AGCACCAACT CGTTTGATGG
 1741 AAGCATTGTG AGCTCATATT TGACAACGCG CATGCCCCCA TGGGCGGGG TGCGTCAGAA
 1801 TGTGATGGGC TCCAGCATTG ATGGTCGCCC CGTCCTGCCC GCAAACCTCA CTACCTTGAC
 1861 CTACGAGACC GTGTCTGGAA CGCCGTTGGA GACTGCAGCC TCCGCGCCG CTTCAGCCGC
 1921 TGCAGCCACC GCCCGCGGGA TTGTGACTGA CTTTGCTTTC CTGAGCCCG TTGCAAGCAG
 1981 TGCAGCTTCC CGTTCATCCG CCCCGCATGA CAAGTTGACG GCTCTTTTGG CACAATTGGA
 2041 TTCTTTGACC CGGGAACCTA ATGTCGTTTC TCAGCAGCTG TTGGATCTGC GCCAGCAGGT
 2101 TTTCCCTCG AAGGCTTCT CCCCTCCCAA TGCGGTTTAA AACATAAATA AAAAACAGAA
 2161 CTCTGTTTGG ATTTGGATCA AGCAAGTGC TTGCTGTCTT TATTTAGGGG TTTTGCGCGC
 2221 GCGGTAGGCC CGGGACCAGC GGTCTCGGTG GTTGAGGGTC CTGTGTATTT TTTCCAGGAC
 2281 GTGGTAAAGG TGA CTCTGGA TGTTCAGATA CATGGGCATA AGCCCGTCTG TGGGGTGGAG
 2341 CTACGACCAC TGCAGAGCTT CATGCTGCGG GGTGGTGTG TAGATGATCC AGTCGTAGCA
 2401 GGAGCGCTGG GCGTGGTGCC TAAAAATGTC TTTCACTAGC AAGCTGATTG CCAGGGGCAG
 2461 GCCCTTGGTG TAAGTGTFTA CAAAGCGGT AAGCTGGGAT GGGTGCATAC GTGGGGATAT
 2521 TTGATGCATC TTGGACTGTA TTTTLAGGTT GGCTATGTTT CCAGCCATAT CCGCCGGG
 2581 ATTCATGTTG TGCAGAACCA CCAGCACAGT GTATCCGGTG CACTTGGGAA ATTTGTCATG
 2641 TAGCTTAGAA GGAATGCGT GGAAGAACTT GGAGACGCC TTTGACCTC CAAGATTTTC
 2701 CATGCATTG TCCATAATGA TGGCAATGG CCCACGGGCG GCGGCCTGGG CGAAGATATT
 2761 TCTGGGATCA CTAACTCAT AGTTGTGTTT CAGGATGAGA TCGTATAGG CCTATTTTAC
 2821 AAAGCGCGGG CGGAGGGTGC CAGACTGCGG TATAATGGTT CCATCCGGCC CAGGGGCGTA
 2881 GTTACCCTCA CAGATTTGCA TTTCCACGC TTTGAGTTCA GATGGGGGGA TCATGTCTAC
 2941 CTGCGGGGCG ATGAAGAAAA CGGTTTCCGG GGTAGGGGAG ATCAGCTGGG AAGAAAGCAG
 3001 GTTCTGAGC AGCTGCGACT TACCGCAGCC GGTGGGCCCG TAAATCACAC CTATTACCGG
 3061 GTGCAACTGG TAGTTAAGAG AGCTGCAGCT GCCGTATCC CTGAGCAGGG GGGCCACTTC
 3121 GTTAAAGCATG TCCTGACTC GCATGTTTTT CCTGACCAA TCCGCGAGAA GGCGCTCGCC
 3181 GCCCAGCGAT AGCAGTCTT GCAAGGAAGC AAAGTTTTTC AACGGTTTGA GACCGTCCGC
 3241 CGTAGGATG CTTTTGAGCG TTTGACCAAG CAGTTCAGG CGGTCCACA GCTCCGCTGC
 3301 CTGCTCTACG GCATCTCGAT CCAGCATATC TCCTCGTTTC GCGGGTTGGG GCGGCTTTCG
 3361 CTGTACGCA GTAGTCGGTG CTCGTCCAGA CGGGCCAGGG TCATGTCTTT CCACGGGCGC
 3421 AGGGTCTCG TCAGCGTAGT CTGGGTACG GTGAAGGGGT GCGCTCCGGG CTGCGCGCTG
 3481 GCCAGGTGC GCTTGAAGG GGTCTGCTG GTGCTGAAGC GCTGCCGCTG TCCGCTTGC
 3541 GCGTCGGCCA GGTAGCATTT GACCATGGTG TCATAGTCCA GCCCTCCG GCGGTGGCCC
 3601 TTGGCGCGCA GCTTGCCTT GGAGGAGGCG CCGCAGCAGG GGCAGTGCAG ACTTTGAGG
 3661 GCGTAGAGCT TGGGCGCGAG AAATACCGAT TCCGGGGAGT AGGCATCCG GCCCGAGGCC
 3721 CCGCAGACGG TCTCGATTCC CACGAGCCAG GTGAGCTCTG GCCGTTCCGG GTCAAAAACC
 3781 AGGTTTCCCC CATGCTTTTT GATGCGTTTC TTACCTCTGG TTTCCATGAG CCGGTGTCCA
 3841 CGCTCGGTGA CGAAAAGGCT GTCCGTGTCC CCGTATACAG ACTTGAGAGG CCTGTCTCG
 3901 ACCGATGCC TTGAGAGCCT TCAACCCAGT CAGCTCCTTC CGGTGGGCGC GGGGCATGAC
 3961 TATCGTCGCC GCACTTATGA CTGTCTTCTT TATCATGCAA CTCGTAGGAC AGGTGCCGGC
 4021 AGCGCTCTGG GTCATTTTCG GCGAGGACCG CTTTCGCTGG AGCGCGACGA TGATCGGCT
 4081 GTCGCTTGGC GTATTCGGAA TCTTGACGCG CCTCGCTCAA GCCTTCGTCA CTGGTCCCCG
 4141 CACCAAACGT TTCGGCGAGA AGCAGGCCAT TATCGCCGGC ATGGCGGGCG ACGCGCTGGG
 4201 CTACGTCTTG CTGGCGTTCG CGACGCGAGG CTGGATGGCC TTCCCCATTA TGATTCTTCT
 4261 CGCTTCCGGC GGCATCGGGA TGCCCGCGTT GCAGGCCATG CTGTCCAGGC AGGTAGATGA
 4321 CGACCATCAG GGCAGCTTC AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCCGGTT
 4381 GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CAAAAAATC GACGCTCAAG
 4441 TCAGAGGTGG CGAAAACCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC
 4501 CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTCTCCC
 4561 TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CCGTGTAGGT
 4621 CGTTCGCTCC AAGCTGGGTG GTGTGCACGA ACCCCCGTT CAGCCCGACT GCTGCGCCTT
 4681 ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC
 4741 AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCCTGAA

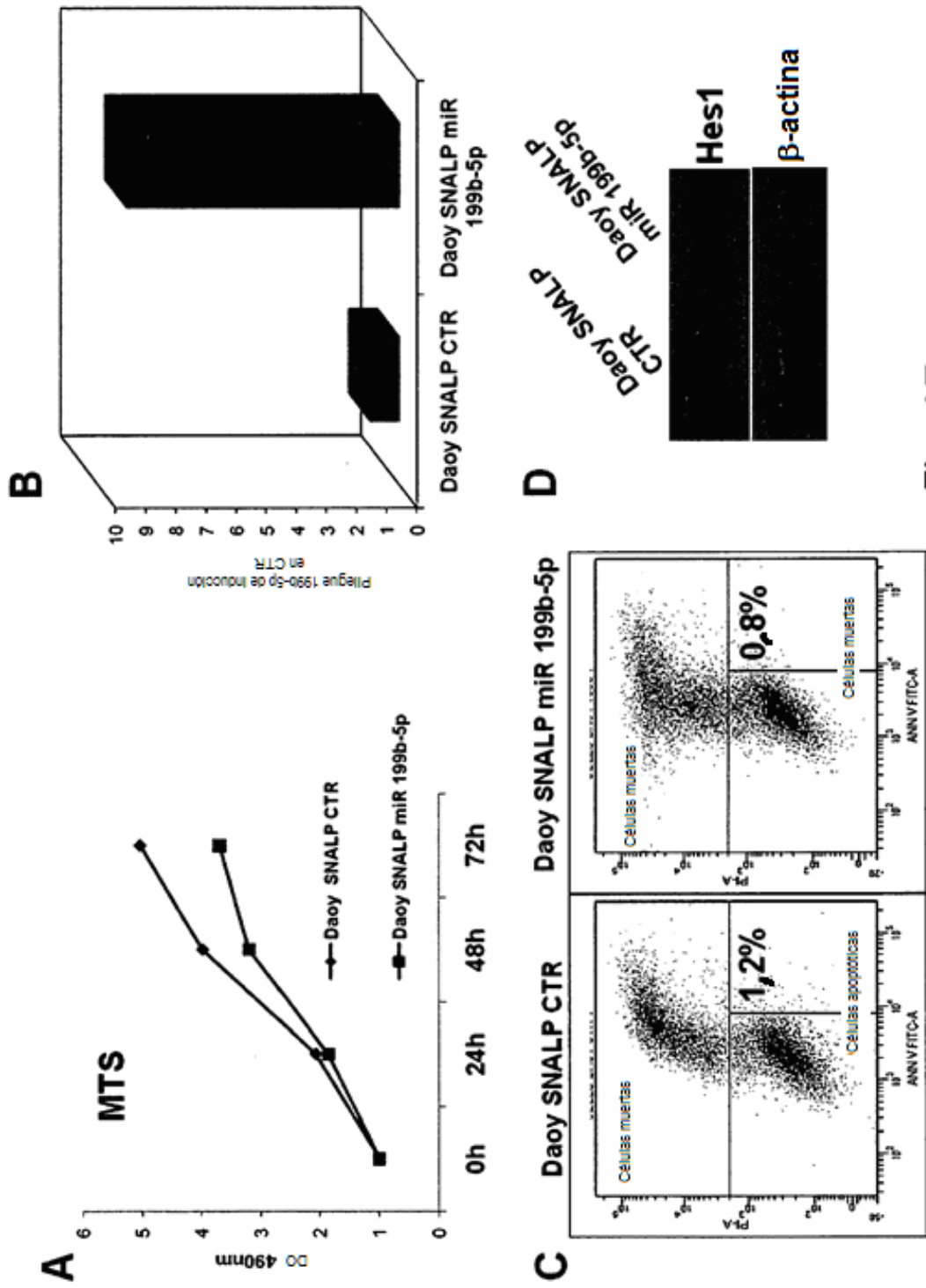
Fig. 16b

```

4801 GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA
4861 GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAAACAAA CCACCGCTGG
4921 TAGCGGTGGT TTTTTTGT TTGCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA
4981 AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT CACGTTAAGG
5041 GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTA AAAATG
5101 AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGT ACCAATGCTT
5161 AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT
5221 CCCCCTCGT TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT
5281 GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAAC AGCCAGCCGG
5341 AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG
5401 TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT
5461 TGCTGCAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC
5521 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT
5581 CGGTCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA TGTTATGGC
5641 AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGA CTGGTGA
5701 GACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC
5761 GTCAACACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
5821 ACGTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA
5881 ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG
5941 AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG
6001 AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT
6061 GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTT CCGCACATT
6121 TCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA
6181 AAATAGGCGT ATCACGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAA

```

Fig. 16c



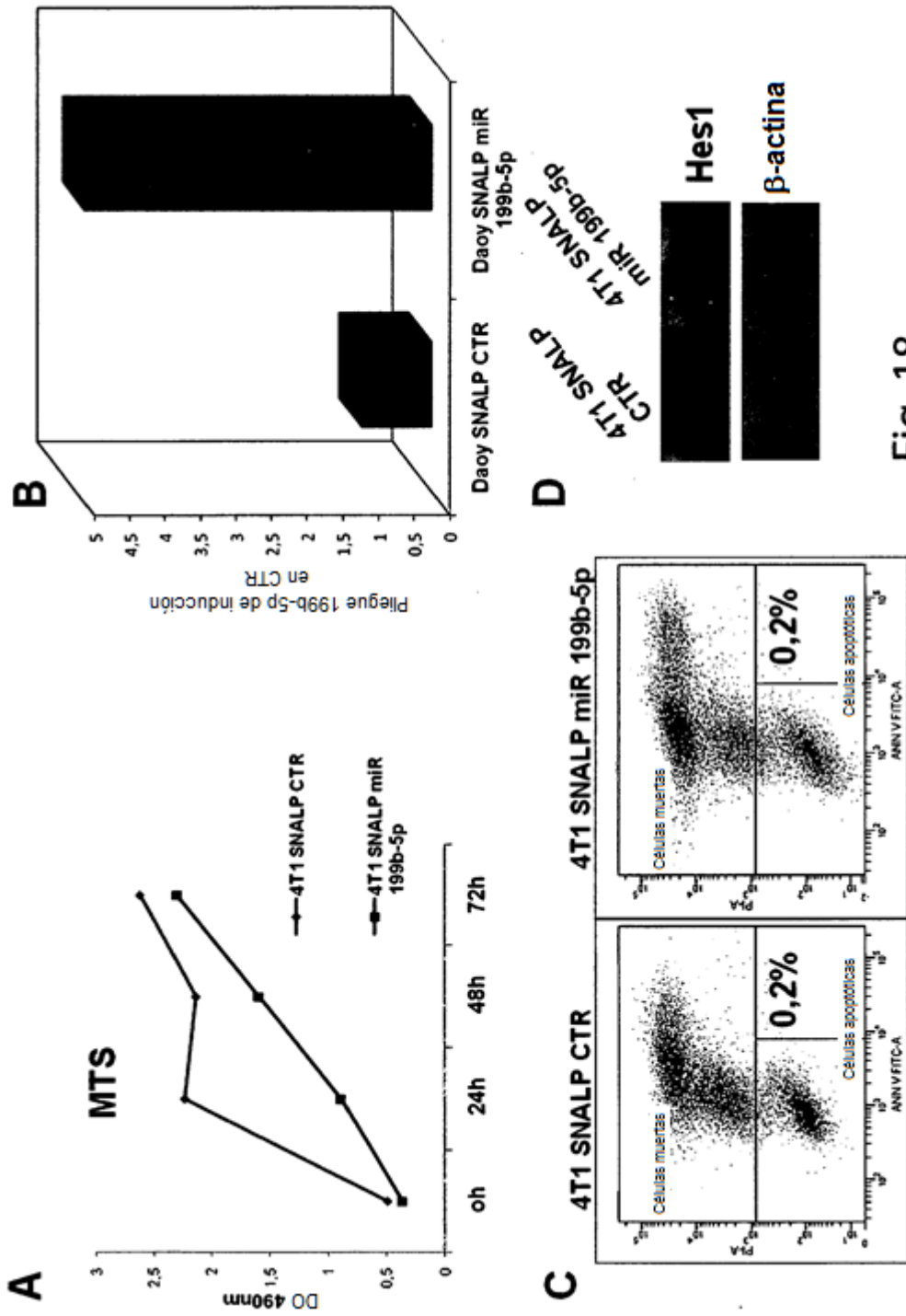


Fig. 18

Anexina V

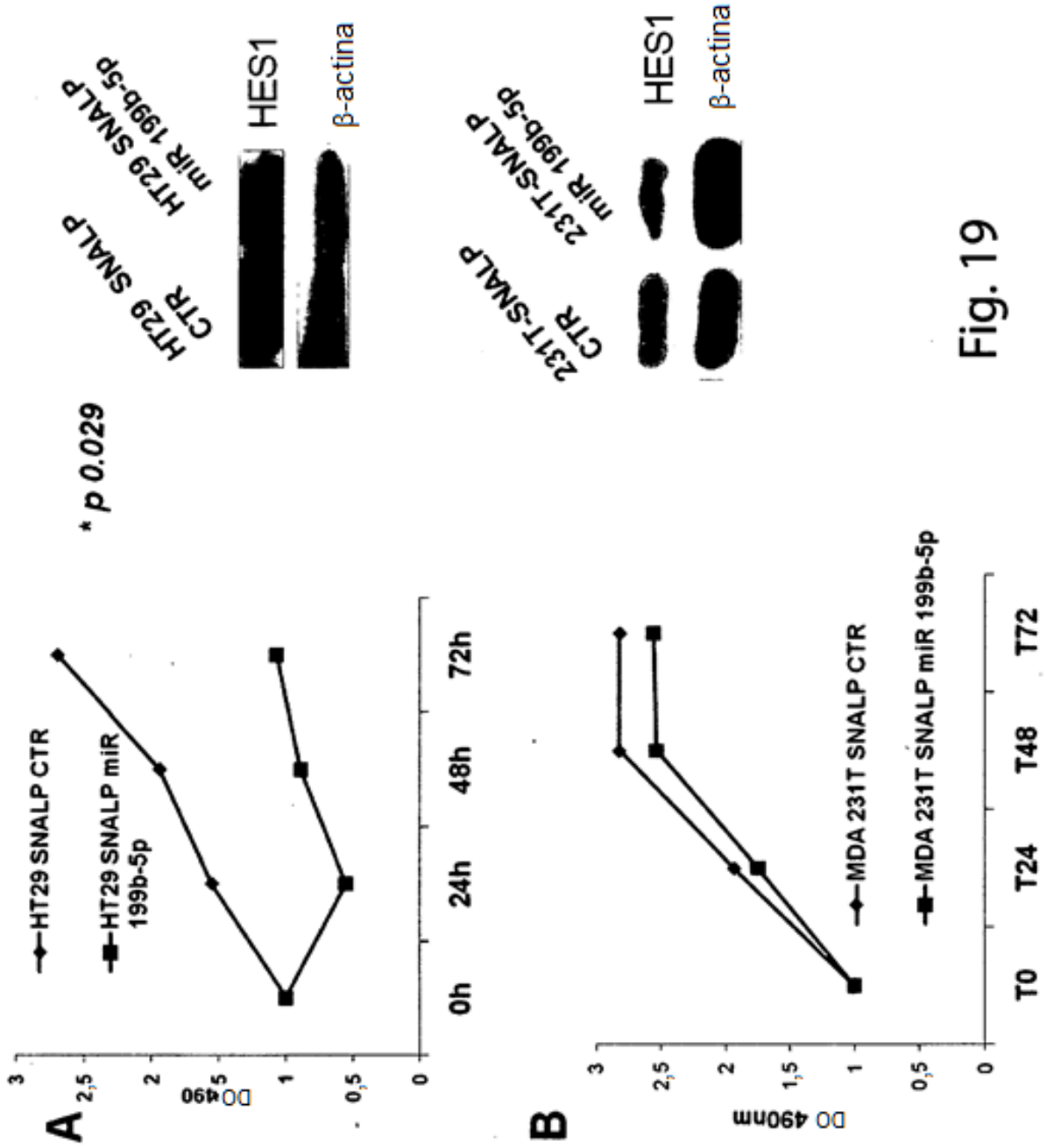


Fig. 19

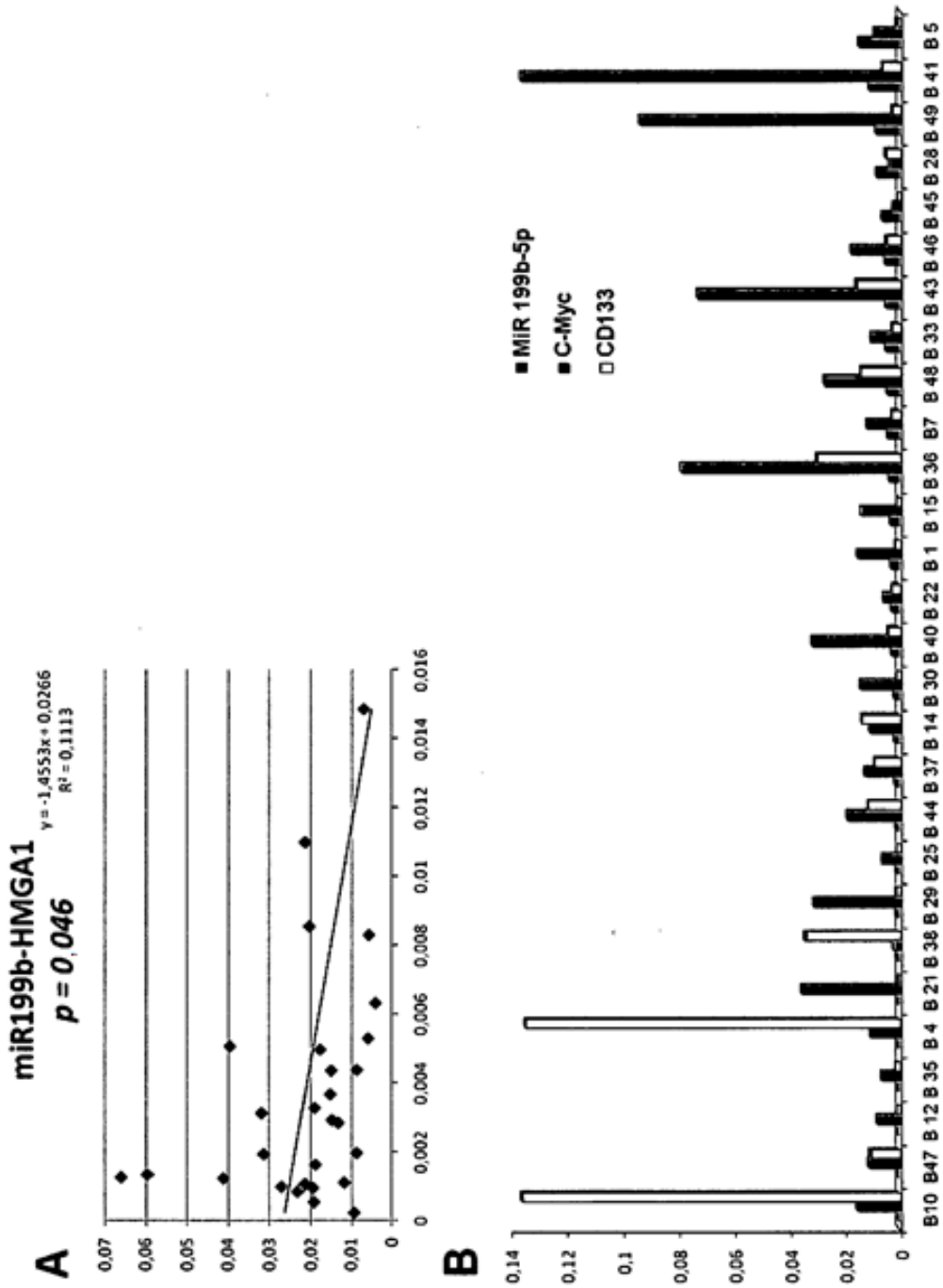


Fig. 20

