

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 736**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2013 PCT/FI2013/050834**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14033367**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2013 E 13767021 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2890986**

54 Título: **Método de selección de una terapia individualizada del cáncer de cerebro**

30 Prioridad:

30.08.2012 FI 20125897

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

25.09.2017

73 Titular/es:

**TURUN YLIOPISTO (100.0%)
Yliopistonmäki
20014 Turun Yliopisto, FI**

72 Inventor/es:

**WESTERMARCK, JUKKA y
KAUR, AMANPREET**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 633 736 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

Método de selección de una terapia individualizada del cáncer de cerebro

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la medicina personalizada. De manera más específica, la invención se refiere a un método de selección de una terapia individualizada de gliomas basada en el perfil proteómico del paciente en el tejido enfermo.

Antecedentes de la invención

10 La medicina personalizada es un campo relativamente joven de la atención sanitaria que se dirige a identificar la información genética, genómica, y clínica de cada paciente, lo que permite hacer predicciones individualizadas exactas sobre la probabilidad de desarrollar una enfermedad determinada, el pronóstico de la enfermedad, y la susceptibilidad a la terapia. Así, la medicina personalizada permite tomar decisiones médicas más fundamentadas, elegir terapias más selectivas, y reducir los costes de la asistencia sanitaria.

15 Los gliomas son una amplia categoría de tumores primarios de cerebro y de médula espinal, con células tumorales que exhiben características de las células gliales y que constituyen alrededor del 42% de todos los tumores de cerebro. Según la Sociedad Americana Contra el Cáncer, los gliomas se pueden dividir en tres subtipos, concretamente astrocitomas, oligodendrogliomas, y ependimomas, dependiendo del tipo de células gliales afectadas. Los astrocitomas surgen de los astrocitos, y constituyen alrededor del 35% de todos los tumores de cerebro. En general, los astrocitomas no son curables, ya que se diseminan por todo el tejido cerebral normal. Los astrocitomas se clasifican normalmente como grado bajo, grado intermedio, o grado elevado, basándose en un examen microscópico de una muestra de biopsia, dependiendo de los criterios usados por el médico que examina la biopsia al microscopio. El grado más alto de astrocitoma se denomina glioblastoma, el tumor maligno de cerebro adulto más habitual. La supervivencia media de los pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) es menor de 14 meses desde el diagnóstico.

25 Debido al panorama genómico heterogéneo de los gliomas, es probable que las terapias futuras requieran una personalización para el genotipo y perfil proteómico del tumor de cada paciente. De hecho, los pacientes con oligodendrogliomas ya se han beneficiado de la medicina personalizada, ya que existe una relación clara entre la respuesta a la quimioterapia y el perfil cromosómico (Cairncross et al., J. Natl. Cancer Inst., 1998, 90: 1473-1479).

30 La expresión de la proteína 12 similar a Bcl-2 (Bcl2L12) está estimulada en la mayoría de glioblastomas humanos, lo que da como resultado resistencia a la apoptosis. De manera interesante, el documento WO 2004/096991 describe que se puede conseguir la sensibilización a estaurosporina en células de glioma humanas por medio del bloqueo de la actividad del polipéptido Bcl2L12 mediante moléculas de siARN.

35 Se ha identificado la proteína fosfatasa metiltransferasa 1 (PME-1) como una proteína asociada al cáncer cuya expresión se correlaciona con la progresión de gliomas astrocíticos de grado bajo hasta glioblastomas malignos (GBMs) (Puustinen et al., Cancer Res. 2009, 69: 2870-2877). PME-1 interacciona con la proteína fosfatasa 2A (PP2A), cuya inhibición es un prerrequisito para la transformación de células humanas (revisado en Westermarck y Hahn, Trends Mol. Med., 2008, 14: 152-160). Se ha propuesto que PME-1 inhibe la actividad de PP2A por medio de su actividad enzimática metilesterasa, necesaria para la desmetilación de la leucina 309 conservada en la subunidad catalítica PP2Ac (Janssens et al., Trends Biochem. Sci., 2008, 33:113-21). Se ha propuesto un mecanismo alternativo de inhibición basado en el análisis estructural del complejo PME-1-PP2A, que demuestra que PME-1 se une directamente a una hendidura catalítica de la subunidad PP2Ac (Xing et al., Cell, 2008, 133:154-163). Sin embargo, todavía no se ha determinado el papel de PME-1 en el desarrollo de los gliomas y su quimiorresistencia.

40 El documento WO 2009/100173 describe que los inhibidores de PME-1 sensibilizan a las células en división anormal hacia protocolos quimioterápicos adicionales. Sin embargo, no se describe ni se propone la sensibilización de las células de cáncer de cerebro a estaurosporina.

45 El documento WO 2012/175798, un documento intermedio publicado después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, describe la relación entre la expresión de PME-1 y ciertos agentes químicos de moléculas pequeñas. De manera más específica, este documento sugiere que el silenciamiento de PME-1 sensibiliza a las células de glioblastoma a estaurosporina y los derivados de la misma.

50 Aunque los estudios recientes han descubierto ciertas moléculas candidatas como posibles objetivos futuros para la terapia personalizada en el tratamiento de los gliomas, también existe una necesidad identificada de identificación y dilucidación de los marcadores que se pueden usar para diferenciar a los pacientes que probablemente se beneficiarían de la quimioterapia de aquellos que probablemente no responderían a dicha terapia.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método de selección de una terapia de gliomas para un paciente que necesita

tal terapia. El método comprende las etapas de a) determinar el nivel de expresión de PME-1 en una muestra quirúrgica o de biopsia obtenida de un tejido cerebral enfermo de dicho paciente; b) usar los resultados obtenidos en la etapa a) como criterios para seleccionar una terapia de gliomas a la que es susceptible dicho paciente, en la que la expresión incrementada de PME-1 indica que dicho paciente no es susceptible a la monoterapia con un derivado de estaurosporina (STS), pero dicho paciente es susceptible a una terapia de combinación con un derivado de STS y un agente de silenciamiento de PME-1, mientras la expresión intacta de PME-1 indica que dicho paciente es susceptible a la terapia de gliomas con un derivado de STS, en el que dicho derivado de STS tiene la Fórmula general (I) descrita más adelante en la presente memoria, y en el que dicho agente de silenciamiento de PME-1 es una molécula de ARNi seleccionada de ARNs bicatenarios pequeños (dsARNs), ARNs de interferencia pequeños (siARNs), siARNs sustratos de Dicer (DsiARNs), precursores de microARN artificial (miARN), y ARNs de horquilla corta (shARNs).

En otra realización adicional, dicho paciente padece un glioma seleccionado de un grupo que consiste en astrocitoma, astrocitoma pilocítico juvenil, astrocitoma de grado bajo, astrocitoma anaplásico, glioblastoma, oligodendroglioma, y ependimoma.

Otros aspectos, realizaciones específicas, objetivos, detalles, y ventajas de la invención se exponen en los dibujos, descripción detallada y ejemplos siguientes.

Breve descripción de los dibujos

A continuación la invención se describirá con más detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

La Figura 1A es una transferencia de Western que demuestra el nivel de expresión de PME-1 en células T98G de glioblastoma humano transfectadas con un dsARN aleatorizado (Scr.) y dsARN específico de PME-1 (PME-1).

La Figura 1B expresa la cantidad de fragmentación nuclear apoptótica en células de glioblastoma T98G transfectadas con dsARN aleatorizado o específico de PME-1 durante 48 horas, y después tratadas con la concentración indicada de diferentes fármacos / inhibidores químicos durante otras 24 horas. Abreviaturas: Chl Cl - cloruro de queleritrina, TMZ - temozolomida, STS - estaurosporina.

La Figura 1C muestra la cantidad de fragmentación nuclear apoptótica en células de glioblastoma T98G transfectadas con dsARN aleatorizado o específico de PME-1 durante 48 horas, y después tratadas con las concentraciones indicadas de estaurosporina (STS) o ligandos inductores de la muerte celular, FasL o TRAIL recombinantes, durante otras 24 horas.

La Figura 1D muestra el incremento dependiente de la dosis en la apoptosis de células T98G transfectadas con dsARN de PME-1 con una concentración creciente de estaurosporina, en comparación con las células transfectadas con dsARN aleatorizado.

La Figura 1E y 1F representan el potencial clonogénico de las células de glioblastoma T98G y U118MG, respectivamente, tras la transfección de dsARN aleatorizado o de PME-1 y el tratamiento con la concentración indicada de estaurosporina durante 2 días.

La Figura 2A representa la inducción de la fragmentación nuclear apoptótica mediante tres dsARNs de PME-1 diferentes, PME-1.1 (SEQ ID N°:1), PME-1.2 (SEQ ID N°: 2) y PME-1.3 (SEQ ID N°: 3), en combinación con el tratamiento con estaurosporina.

La Figura 2B es una transferencia de Western que demuestra la actividad de silenciamiento de PME-1 de un dsARN aleatorizado (Scr.) y tres dsARNs específicos de PME-1 diferentes (PME-1.1, es decir SEQ ID N°: 1, PME-1.2, es decir SEQ ID N°: 2, y PME-1.3, es decir SEQ ID N°: 3) en células T98G.

La Figura 2C es el análisis densitométrico de la imagen de transferencia de Western anteriormente mencionada que muestra los niveles de PME-1 residuales en células T98G transfectadas con dsARNs específicos de PME-1 (PME-1.1, es decir SEQ ID N°: 1, PME-1.2, es decir SEQ ID N°: 2, y PME-1.3, es decir SEQ ID N°: 3) en comparación con las células transfectadas con siARN aleatorizado.

La Figura 2D muestra el incremento dependiente de la dosis en la apoptosis de células T98G transfectadas con dsARN de PME-1 con una concentración creciente de estaurosporina en comparación con las células sin transfectar.

La Figura 3A muestra el efecto de la transfección con dsARN de PME-1 y el tratamiento con estaurosporina sobre la viabilidad de las células T98G.

La Figura 3B muestra el efecto de la transfección con dsARN de PME-1 y el tratamiento con estaurosporina sobre los niveles de las caspasas-3 y -7 activas en células T98G. La Figura 3C muestra el efecto del tratamiento con el inhibidor de pan-caspasa, Z-VAD-FMK, sobre la apoptosis mediada por dsARN de PME-1 y estaurosporina, medido como la cantidad de fragmentación nuclear.

La Figura 4A muestra el efecto del pretratamiento de células T98G con el inhibidor de PP2A, ácido okadaico, sobre la apoptosis mediada por dsARN de PME-1 y estaurosporina, medido como la cantidad de fragmentación nuclear.

5 La Figura 4B muestra una comparación entre el potencial de inducción de apoptosis de dsARN específico de PME-1 o específico de CIP2A tras el tratamiento con estaurosporina en comparación con las células transfectadas con dsARN aleatorizado.

La Figura 4C es una imagen de transferencia de Western que demuestra la actividad de silenciamiento de PME-1 y CIP2A de un dsARN aleatorizado (Scr.), dsARN específico de PME-1 (PME-1) y dsARN específico de CIP2A (CIP2A) en células T98G de glioblastoma humano.

10 La Figura 5A muestra la cantidad de fragmentación nuclear apoptótica en células de glioblastoma T98G tras la transfección con dsARN aleatorizado o específico de PME-1 durante 48 horas y el tratamiento con la concentración indicada de diferentes derivados de estaurosporina / derivados durante otras 24 horas.

La Figura 5B representa el potencial clonogénico de células de glioblastoma T98G transfectadas con dsARN aleatorizado o específico de PME-1 tras 2 días de tratamiento con la concentración indicada de derivados de estaurosporina, PKC412 y K252a.

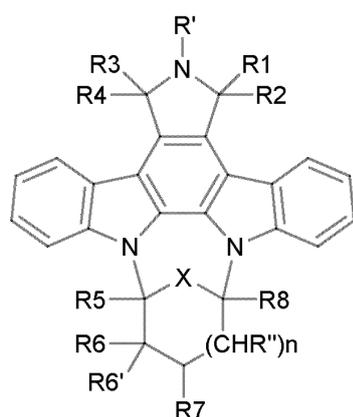
15 Las Figuras 5C y 5D representan el potencial clonogénico de células de glioblastoma U251MG y U87MG transfectadas con dsARN aleatorizado o específico de PME-1, respectivamente, tras 2 días de tratamiento con una concentración indicada de estaurosporina (STS), PKC412 y K252a.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que el nivel de expresión de PME-1, pero no de otra proteína inhibidora de PP2A, CIP2A, en las células de glioma se puede usar para la selección de una terapia de gliomas a la que es susceptible el paciente en cuestión. En ciertas realizaciones, se puede usar el nivel de expresión de PME-1 para predecir la sensibilidad de los cánceres respectivos a ciertos agentes quimioterápicos de moléculas pequeñas, concretamente derivados de estaurosporina (STS).

25 Más específicamente, se ha descubierto que las células de glioma con niveles intactos de expresión de PME-1 responden significativamente mejor estadísticamente al tratamiento con derivados de STS que las células de glioma positivas para la expresión de PME-1 (Ejemplo 2). Así, se ha previsto que el nivel de expresión de PME-1 en una muestra obtenida de un paciente de glioma se puede usar como criterio de estratificación para identificar a los sujetos que probablemente se beneficiarían del tratamiento con derivados de STS y los que no.

30 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "derivado de STS" se refiere a cualquier compuesto similar estructuralmente a STS, que incluye, pero sin limitación, los compuestos de Fórmula (I) y cualquier estereoisómero, racemato, sal, solvato o profármaco de los mismos. Los compuestos de Fórmula (I) tienen la estructura general siguiente:



en la que

35 R' es H o alquilo;

R'' es H o alcoxi;

R1 y R2 son H o forman juntos oxo;

R3 y R4 son independientemente H, OH o forman juntos oxo;

R5, R6, R6', R7, y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxicarbonilo, o mono- y dialquilamino;

X es CH₂ u O; y

n es 0 o 1.

- 5 El término "alquilo" mencionado anteriormente incluye los grupos alquilo C1-6 lineales y ramificados, tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, y similares. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1-3 que contiene de 1 a 3 átomos de carbono.

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término "alcoxi" se refiere a grupos alcoxi C1-6 lineales y ramificados, tales como metoxi, etoxi, propoxi, y similares. En ciertas realizaciones, el grupo alcoxi es un grupo alcoxi C1-3 que contiene 1 a 3 átomos de carbono.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "hidroxialquilo" se refiere a cualquiera de los grupos alquilo C1-6 anteriormente mencionados sustituidos con -OH.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alcoxicarbonilo" se refiere a cualquiera de los grupos alcoxi C1-6 anteriormente mencionados sustituidos con -COOH.

- 15 El término "amino" se refiere a -NH₂.

El término "monoalquilamino" incluye cualquiera de los grupos alquilo anteriormente mencionados sustituidos con un grupo amino.

El término "dialquilamino" se refiere a cualquiera de los grupos alquilo anteriormente mencionados sustituidos con dos grupos amino.

- 20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "estereoisómero" es un término general para todos los isómeros de moléculas individuales que difieren solamente en la orientación espacial de sus átomos. Incluye los enantiómeros e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares entre sí (diastereómeros).

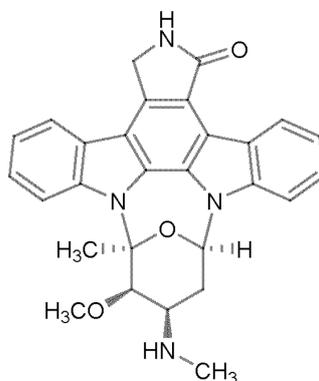
Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "centro quiral" o "centro asimétrico" se refiere a un átomo de carbono en el que están unidos cuatro grupos diferentes.

- 25 El término "enantiómero" se refiere a una molécula que no es superponible sobre su imagen especular, y por lo tanto es ópticamente activa, en la que el enantiómero rota el plano de la luz polarizada en una dirección y su imagen especular rota el plano de la luz polarizada en la dirección opuesta.

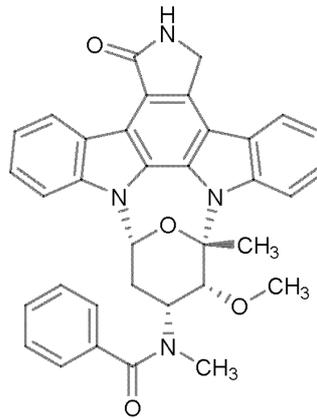
El término "racemato" se refiere a una mezcla de partes iguales de enantiómeros, y que es ópticamente inactiva.

Los ejemplos no limitantes de los derivados de STS de Fórmula (I) incluyen los siguientes:

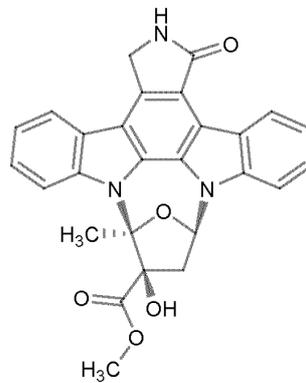
- 30 Estaurosporina (STS); nombre químico [9S-(9 α ,10 β ,11 β ,13 α)]-2,3,10,11,12,13-Hexa-hidro-10-metoxi-9-metil-11-(metilamino)-9,13-epoxi-1H,9H-diindolo[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-1-ona, número CAS 62996-74-1:



- 35 PKC412, también conocida como Midostaurina, 4'-N-benzoil estaurosporina, o CGP 41251; nombre químico [9S-(9 α ,10 β ,11 β ,13 α)]-N-(2,3,10,11,12,13-Hexahidro-10-metoxi-9-metil-1-oxo-9,13-epoxi-1H,9H-diindolo[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il)-N-metil benzamida; número CAS 120685-11-2:

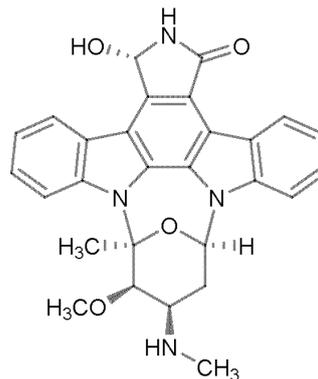


K252a, también conocido como SF 2370; nombre químico éster metílico de ácido (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahidro-10-hidroxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-10-carboxílico; número CAS 99533-80-9:

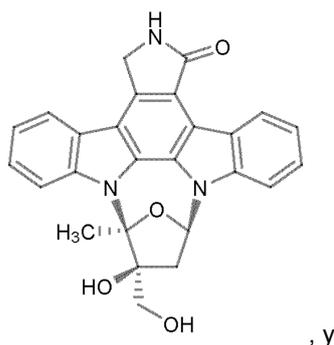


5

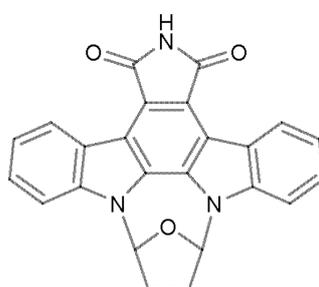
UCN-01, también conocida como 7-Hidroxi-estaurosporina; nombre químico (9S)-2,3,10,11,12,13-Hexahidro-3 α -hidroxi-10 α -metoxi-9-metil-11 α -metilamino-9 β ,13 β -epoxi-1H,9H-diindolo[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-1-ona; número CAS 112953-11-4:



10 CEP-701, también conocido como Lestaurtinib; nombre químico (9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahidro-10-hidroxi-10-(hidroximetil)-9-metil-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-1-ona; número CAS 111358-88-4:



SB-218078; nombre químico 9,10,11,12-Tetrahidro-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-1,3(2H)-diona; número CAS 135897-06-2:



5 En la presente memoria, la expresión "sensible a un tratamiento con un derivado de STS" es equivalente a las expresiones "sensible a un derivado de STS" y "susceptible a un tratamiento con un derivado de STS", y significa que un derivado de STS puede tener potencialmente un efecto terapéutico en un paciente al que se va a administrar el derivado de STS.

10 Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "tratamiento" y "efecto terapéutico" se refieren no solamente a la curación completa de una enfermedad, sino también a la prevención, mitigación, y mejora de una enfermedad o de los síntomas relacionados con ella. Los términos "tratamiento" y "terapia" se pueden usar de manera intercambiable. Por lo tanto, la expresión "terapia del cáncer" incluye, por ejemplo, la inhibición o estabilización de la progresión del cáncer, el tamaño del tumor, y/o el número de metástasis.

15 Se puede monitorizar el efecto terapéutico en un paciente mediante cualquier método conocido para las personas de experiencia habitual en la técnica clínica de tratamiento de trastornos relacionados con el cáncer. Tales métodos incluyen, pero sin limitación, la tomografía y la detección de marcadores tumorales.

En la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un sujeto humano o animal que necesita una terapia de gliomas. Así, los métodos de la presente invención son aplicables a aplicaciones humanas y veterinarias.

20 En la presente memoria, el término "glioma" se refiere a tumores de cerebro primarios que surgen de las células gliales, e incluye astrocitomas tales como astrocitoma pilocítico juvenil, astrocitoma de grado bajo, astrocitoma anaplásico, o glioblastoma, oligodendrogliomas, y ependimomas.

25 Las muestras quirúrgicas o de biopsias obtenidas de un paciente de glioma son tipos de muestras típicas en las que analizar el nivel de expresión de PME-1. Según ciertas realizaciones, las muestras quirúrgicas o de biopsias obtenidas de un tejido cerebral enfermo contienen también el tejido sano adyacente para permitir las comparaciones entre los niveles de expresión de PME-1 en dichos tejidos. Se puede determinar el nivel de expresión de PME-1 en una muestra de tejido mediante cualquier método de detección adecuado directo o indirecto conocido en la técnica. Tales métodos incluyen, pero sin limitación, la inmunohistoquímica mediante el uso de un anticuerpo específico hacia PME-1. Tales anticuerpos están disponibles en la técnica, y se pueden desarrollar anticuerpos anti-PME-1 adicionales tal como conoce una persona experta. La detección de la unión de un anticuerpo anti-PME-1 se puede llevar a cabo por medio de marcadores, tales como marcadores fluorescentes, luminiscentes, cromogénicos, fotométricos o radiactivos. Además, se prevé que el nivel de expresión de la proteína PME-1 se pueda correlacionar con el nivel de expresión del mRNA de PME-1, y se podría determinar, p.ej., mediante PCR en tiempo real tal como se conoce en la técnica.

35 Las expresiones "expresión incrementada de PME-1" o "positivo para la expresión de PME-1" quieren decir una expresión significativamente incrementada de PME-1 en comparación con un tejido no maligno relacionado. En ciertas realizaciones, dicho incremento significativo es estadísticamente significativo. Los métodos estadísticos para determinar la significación de una diferencia en los niveles de expresión de PME-1 están fácilmente disponibles en la

técnica.

En ciertas realizaciones, el nivel de expresión de PME-1 es de al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, en comparación con un tejido sano correspondiente para considerarlo incrementado.

5 En la presente memoria, la expresión "expresión intacta de PME-1" significa que un tejido enfermo no expresa niveles significativamente mayores de PME-1 que un tejido sano correspondiente.

En ciertas realizaciones, sin embargo, la expresión de PME-1 podría estar ligeramente incrementada, es decir, menos de 1,5 veces, en comparación con un tejido no maligno correspondiente, y todavía considerarse intacta.

10 Según una realización de la presente invención, un paciente cuyo tejido de glioma es positivo para PME-1 probablemente se beneficiaría menos de un tratamiento con derivados de STS que un paciente correspondiente cuyo tejido de glioma expresa niveles intactos de PME-1. Así, se recomiendan regímenes de terapia distintos del tratamiento con derivados de STS para los pacientes positivos para la expresión de PME-1.

15 Por otra parte, se prevé que los pacientes cuyo tejido de glioma exhibe una expresión de PME-1 incrementada se pueden beneficiar del silenciamiento combinado de la expresión de PME-1, a nivel transcripcional o postranscripcional, y del tratamiento con derivados de STS. Tal terapia de combinación se puede administrar de manera simultánea, de manera secuencial, o por separado. En ciertas realizaciones, dicha terapia de combinación puede incluir la cirugía del tejido maligno.

20 Los medios y métodos para el silenciamiento de la expresión de PME-1 están fácilmente disponibles en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, la interferencia de ARN (ARNi). Los ejemplos no limitantes de ARNs pequeños adecuados para mediar en ARNi incluyen los ARNs bicatenarios pequeños (dsARNs), ARNs de interferencia pequeños (siARNs), siARNs sustratos de Dicer (DsiARNs), precursores de microARN artificial (miARN), y ARNs de horquilla corta (shARNs). Las moléculas de siARN específicas de PME-1 se han descrito, p.ej., en la publicación de patente US 2009/182134 (SEQ ID N°:s 5 a 34), mientras la solicitud de patente finlandesa FI 20115640 describe siARNs y shARNs específicos de PME-1 (SEQ ID N°:s 35 a 40). Se pueden diseñar moléculas de dsARN adicionales mediante el uso de algoritmos comerciales y no comerciales, tal como conoce una persona experta.

25 Los ejemplos de otras maneras de silenciar la expresión de PME-1 incluyen el uso de oligonucleótidos inversos monocatenarios (ARN o ADN) y tecnología de ribozimas, como se conoce bien en la técnica.

Cualquiera de las moléculas a usar para el silenciamiento de la expresión génica de PME-1 se puede modificar según los métodos habituales conocidos en la técnica.

30 Según una realización adicional de la presente invención, es probable que los pacientes cuyo tejido de glioma expresa niveles intactos de PME-1 se beneficien de la monoterapia con derivados de STS. Tal como se usa en la presente memoria, el término "monoterapia" se refiere a una terapia con al menos un derivado de STS sin silenciamiento de la expresión de PME-1. Si se desea, dicha terapia de STS se puede combinar con una cirugía y/o con cualquier quimioterapia sinérgica o aditiva.

35 Será obvio para una persona experta en la técnica que, a medida que la tecnología avanza, el concepto inventivo se puede poner en práctica de diversas maneras. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Materiales y Métodos

40 Cultivo de células eucarióticas y transfecciones con ARN de interferencia pequeño (siARN): Para este estudio, se usaron líneas de células de glioblastoma humano T98G, U118MG, U251MG y U87MG. Las células T98G y U251MG se cultivaron en medio MEM de Eagle, U118MG en DMEM (Sigma-Aldrich) y U87MG en DMEM/F-12 (Gibco Products, Invitrogen) complementados con un 10% de FCS inactivado térmicamente y penicilina (100 unidades/mL)-estreptomicina (100 Ag/mL) en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ a 37 °C. Las transfecciones con ARN de interferencia pequeño (siARN) se llevaron a cabo con el reactivo Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las transfecciones se llevaron a cabo mediante el uso de un protocolo de transfección directa en todos los experimentos excepto para el ensayo CellTiter-glo and Caspase-glo, en los que las transfecciones inversas se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. Se usaron las siguientes secuencias de siARN: aleatorizado (5'-GUA ACA AUG AGA GCA CGG C-3'; SEQ ID N°:4), PME-1 (5'-GGA AGU GAG UCU AUA AGC A-3'; SEQ ID N°:1), PME-1 (5'-UCA UAG AGG AAG AAG AAG A-3'; SEQ ID N°:2) o PME-1 (5'-AGG UCA AGA AUC CUG AAG A-3'; SEQ ID N°:3).

Inhibidores químicos y fármacos: Se adquirió un grupo de cribado de inhibidores pequeños que contenía H-7, H-8, H-89, cloruro de queleritrina (Chl Cl), Sunitinib, Tandutinib, Lapatinib, Vandetanib, PKC412 y K252a de Biaffin GmbH & Co KG. El Hidrocloruro de Topotecano se adquirió de Selleck Chemicals. UO126, LY 294002, RO-31-8220, GÖ 6976 y SB 218078 se adquirieron de Calbiochem. Estaurosporina (STS), CEP-701, UCN-01 se obtuvieron de Sigma-

Aldrich; Temozolomida (TMZ), Arciriaflavina-A y K252c de Tocris Bioscience; Rebecamicina de Enzo Life Sciences y Enzastaurina de LC Laboratories. El inhibidor de pan-caspasa Z-VAD-FMK, el inhibidor de PP2A ácido okadaico, y los activadores selenato sódico y xilulosa-5-fosfato se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Otro activador de PP2A, FTY720, se adquirió de Cayman Chemicals. La proteína de fusión recombinante humana Fc-FasL y la cremallera de isoleucinas recombinante humana TRAIL (TRAIL) fueron un obsequio del profesor John Eriksson (Universidad Åbo Akademi). Todos los productos químicos se reconstituyeron como recomendó el proveedor en agua o DMSO.

Transferencia de Western y anticuerpos: Las células cultivadas y tratadas se lisaron en tampón de muestras SDS 2X/ Tampón Laemmli, se sometieron a ebullición y se resolvieron mediante SDS-PAGE con el uso de geles de acrilamida del 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon y se incubaron con la dilución necesaria de anticuerpo primario y dilución 1:5000 de anticuerpo secundario en un 5% de leche-PBS-Tween20 durante el tiempo necesario, y se revelaron mediante quimioluminiscencia aumentada (ECL). Se adquirieron anticuerpos anti-PME-1 (clon H-226) y anti-CIP2A (clon 2G10-3B5) (dilución 1:1000) de Santa Cruz Biotechnology. Se adquirió el anticuerpo anti-actina (clon AC-40) (dilución 1:10.000) de Sigma-Aldrich. Se llevó a cabo el análisis densitométrico de las transferencias de Western mediante el uso del programa informático analizador de imágenes MCID.

Ensayo de viabilidad celular: Se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo CellTiter-glo (CTG) que mide los niveles celulares de ATP como indicador de células metabólicamente activas y viables. El kit de reactivos CTG se adquirió de Promega Corp., y los ensayos se llevaron a cabo según sus recomendaciones. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de poliestireno blanco (Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc.), y se midió la luminiscencia con un lector de placas Victor2 de Perkin Elmer.

Análisis de la actividad de Caspasa-3 y -7: La actividad de Caspasa-3 y -7 se midió mediante un método basado en luminiscencia, que utiliza un sustrato que contiene el péptido objetivo de Caspasa-3 y -7 DEVD, denominado Ensayo Caspasa-Glo 3/7 (Promega Corp.). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de poliestireno blanco (Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc.) según las instrucciones del fabricante, y se midió la luminiscencia con un lector de placas Victor2 de Perkin Elmer.

Ensayo de apoptosis mediante estimación de la fracción sub-G0/G1: El porcentaje de la fracción sub-G0/G1 que contenía núcleos fragmentados teñidos con yoduro de propidio (PI) se tomó como una medida de las células apoptóticas. Se colocaron en placas 3,5-4 x 10⁴ células en placas de 24 pocillos, se transfectaron con siARN durante 48 hrs, y después se trataron con la concentración indicada de los compuestos de ensayo en medios nuevos. Después de 24 hrs de tratamiento, se recogieron las células flotantes y adherentes mediante centrifugación. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 400 µl de tampón PI hipotónico, que contenía citrato trisódico 40 mM (Merck), 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y 50 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) en PBS, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos en la oscuridad. Se llevó a cabo un análisis mediante citometría de flujo de núcleos teñidos con PI, y los datos registrados se analizaron mediante el uso de un citómetro de flujo y programa informático FACScan (Becton Dickinson), respectivamente.

En los experimentos en los que se usó el inhibidor de pan-caspasa, las células se mantuvieron en medios de crecimiento que contenían Z-VAD-FMK 30 µM comenzando desde la 18 hrs tras la transfección hasta la tinción con PI.

Ensayo de formación de colonias: Las células colocadas en placas a una densidad muy baja (4-6 x 10³) en placas de 6 pocillos se dejaron crecer durante alrededor de 7 días hasta que formaron colonias pequeñas. Estas células se transfectaron después con siARN aleatorizado o de PME-1 mediante el uso de reactivo Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Después de 48 hrs, se administraron los tratamientos con la concentración indicada de fármacos químicos durante otras 48 hrs. Las colonias de células se lavaron con PBS, se fijaron con un 3,7% de formaldehído y se tiñeron con una disolución de violeta cristal del 0,2% (hecha en un 10% de etanol) durante 15 minutos a temperatura ambiente cada una. La tinción en exceso se eliminó mediante lavados repetidos con PBS. Las placas se secaron y se tomaron fotografías con una cámara Olympus SP-600UZ o un escáner Epson Perfection V700, y se analizaron con ImageJ.

Análisis Estadístico: El nivel de significación de las diferencias entre los valores medios de dos grupos de datos se determinó mediante el uso de la prueba t de Student para datos independientes suponiendo varianzas iguales entre las medias de las muestras. Todos los valores de p fueron bilaterales. Los parámetros con un valor de probabilidad p<0,05 se representaron como estadísticamente significativos, y p<0,001 como una diferencia altamente significativa.

Resultados

Para estudiar el papel de PME-1 en la supervivencia de las células de cáncer y la sensibilidad a diferentes fármacos químicos, se transfectaron de manera transitoria células T98G de glioblastoma humano con siARN de PME-1 durante 72 hs para reducir de manera eficaz los niveles de proteína PME-1 (Figura 1A). Las células T98G que contenían niveles normales o reducidos de PME-1 (células transfectadas con siARN aleatorizado representado en SEQ ID N°:4 o siARN de PME-1 representado en SEQ ID N°:1, respectivamente) se trataron con diferentes fármacos

químicos que incluían inhibidores ampliamente específicos de serin-treonina proteína quinasas (H7, H8, H89, cloruro de queleritrina, UO126, LY 294002 y Estauosporina), inhibidores de tirosina quinasas (Sunitinib, Tandutinib, Lapatinib y Vandetanib), inhibidor de ADN topoisomerasa I (Topotecan) y un fármaco de metilación del ADN, Temozolomida (TMZ), que se usa actualmente para el tratamiento del glioblastoma multiforme (GBM).

5 A las células T98G transfectadas con siARN durante 48 hrs se les administraron tratamientos con fármacos durante 24 hrs y se lisaron posteriormente, y sus núcleos se tiñeron mediante el uso de un tampón de yoduro de propidio hipotónico. Se analizaron los cambios en los lisados en la fracción sub-G0/G1 de núcleos fragmentados mediante citometría de flujo (FACS) (Figura 1B). La condensación y la fragmentación del núcleo es una característica bioquímica clave de la apoptosis, y el análisis de sub-G0/G1 se ha usado de manera generalizada para la detección de la apoptosis (FEBS Lett., 1986, 194(2):347-50; Cytometry, 1991, 12(4):323-329; Nature Protocols, 2006, 1:1458-1461).

10 Como se ilustra en la Figura 1B, las células T98G que expresan niveles intactos de PME-1 no respondieron bien al tratamiento con fármacos distintos de TMZ y STS. Sin embargo, la reducción de PME-1 incrementó extraordinariamente la sensibilidad de las células a STS, tal como se calcula mediante el nivel muy elevado de fragmentación nuclear inducida. La reducción de PME-1 incrementó hasta cierto punto el efecto inductor de la apoptosis de todos los productos químicos ensayados, pero solamente se consideró moderado el efecto de H7, Sunitinib, LY 294002, y TMZ. En otras palabras, se descubrió que el efecto sinérgico de la reducción de PME-1 fue específico de STS, ya que el tratamiento de las células con la mayoría de los compuestos químicos (Figura 1B) o con los ligandos inductores de la muerte celular, FasL (proteína de fusión Fc-FasL recombinante) y TRAIL (Figura 1C) no mostró la misma tendencia.

15 Además, se descubrió que STS indujo la apoptosis de una manera dependiente de la dosis en las células con reducción de PME-1 a concentraciones que no indujeron la muerte celular en las células transfectadas con siARN aleatorizado (Figura 1D). Sin embargo, a concentraciones mayores de 50 nM, STS solo comenzó a inducir la muerte celular incluso en las células T98G de control (transfectadas con siARN aleatorizado).

20 A continuación, se ensayó el efecto de la expresión de PME-1 sobre la sensibilidad de las células de glioblastoma hacia STS mediante un ensayo de formación de colonias en células de glioblastoma T98G y otra línea celular de glioblastoma U118MG. Para este experimento, se cultivaron estas células en placas de 6 pocillos hasta la formación de colonias pequeñas, que se transfectaron después con siARN aleatorizado o de PME-1 durante 48 hrs, seguido de tratamiento con STS a las concentraciones indicadas durante otras 48 hrs. Las colonias se fijaron con formaldehído, se tiñeron con violeta cristal y se analizaron las fotografías con Image J. Las células que expresaban niveles intactos de PME-1 no respondieron bien al tratamiento con STS, mientras la reducción de PME-1 sensibilizó a las células y dio como resultado la pérdida casi completa de colonias (Figuras 1E y 1F). Se obtuvieron resultados similares con ambas líneas celulares de glioblastoma.

25 Para excluir la posibilidad de un efecto de selección incorrecta del objetivo específico de secuencia del siARN de PME-1 usado (SEQ ID N°: 1) en los experimentos anteriores, se transfectaron tres secuencias de siARN específicas de PME-1 diferentes (SEQ ID N°:s 1 a 3) en células T98G, y se analizó la fragmentación nuclear apoptótica tras el tratamiento con STS (Figura 2A). Se midió la eficacia de estos siARNs de PME-1 mediante transferencia de Western (Figura 2B), y se cuantificaron y normalizaron las intensidades de las bandas con respecto a beta-actina (Figura 2C). Todas las secuencias de siARN de PME-1 fueron capaces de sensibilizar las células de glioblastoma T98G hacia la apoptosis mediada por STS. Para eliminar cualquier posible efecto de fondo provocado por la transfección de siARN aleatorizado, las células T98G sin transfectar se trataron con una concentración creciente de STS, y se comparó la fragmentación nuclear apoptótica en estas células con las células que recibieron siARN de PME-1 y la misma concentración de STS (Figura 2D). Se observó una cantidad limitada de muerte celular con STS solo a concentraciones mayores de 30 nM. Por otra parte, las células con inhibición de PME-1 fueron muy sensibles a la muerte celular inducida por STS incluso a las concentraciones más bajas usadas en este experimento.

30 Para estudiar las características de la muerte celular inducida por STS en células con reducción de PME-1, primero se analizó el efecto de esta combinación doble de siARN de PME-1 y el tratamiento con STS sobre la viabilidad de las células de glioblastoma T98G mediante un ensayo Cell-titer-glo (CTG) (Figura 3A). Los resultados se correlacionan claramente con el análisis de sub-G0/G1, ya que la reducción de PME-1 redujo la viabilidad celular en una pequeña fracción, pero cuando las mismas células también recibieron el tratamiento con STS hubo una disminución drástica de la viabilidad celular.

35 Otra característica bioquímica de la apoptosis es la activación de las cisteína-aspártico proteasas efectoras Caspasa-3 y 7. Se descubrió que la reducción solamente de PME-1 incrementó la actividad de la Caspasa-3/7 más de 2 veces, que en combinación con el tratamiento con STS se eleva por encima de 6 veces (Figura 3B), lo que sugiere que las Caspasas están implicadas en la inducción de la apoptosis. Para verificar adicionalmente el papel de la inducción por Caspasas, las células que recibieron tratamiento con siARN de PME-1 y STS se trataron con un inhibidor de pan-caspasa, z-VAD-fmk, a lo largo del experimento y se analizó la apoptosis mediante un ensayo de fragmentación nuclear (Figura 3C). Se descubrió una inversión completa de la apoptosis mediada por STS en las células con reducción de PME-1 mediante la inhibición de la actividad de Caspasas, lo que sugiere que esta apoptosis es dependiente completamente de la inducción de Caspasas.

A continuación, el objetivo fue investigar el posible mecanismo tras la resistencia mediada por PME-1 de las células de glioblastoma hacia la apoptosis inducida por STS. Debido a que el único objetivo directo establecido de PME-1 es PP2A, se usó un inhibidor químico de PP2A, ácido okadaico (OA), suponiendo que debería invertir el efecto de la inhibición de PME-1, y por lo tanto estimular la supervivencia celular. De hecho, el pretratamiento de células de glioblastoma T98G con OA durante 24 hrs antes del tratamiento con STS fue suficiente para rescatar a las células de la apoptosis mediada por siARN de PME-1 y STS de una manera dependiente de la dosis (Figura 4A). Esto llevó a investigar además si estos efectos de la apoptosis mediada por PP2A son específicos de PME-1 o se comparten con otras proteínas inhibitorias/reguladoras de PP2A, y se comparó la reducción de PME-1 y CIP2A por su capacidad de sensibilizar a las células de glioblastoma hacia la apoptosis en respuesta al tratamiento con STS. Se descubrió que la inhibición de CIP2A incrementó la apoptosis en un grado muy pequeño, de forma que no se puede considerar un efecto sinérgico como el mediado por las células con reducción de PME-1 (Figura 4B), lo que apoya la idea de que estos efectos son específicos de la inhibición de PME-1. La inhibición eficaz de CIP2A y PME-1 mediante sus siARNs respectivos se verificó mediante transferencia de Western (Figura 4C).

Todos los resultados anteriores demuestran que las células de glioblastoma positivas para PME-1 no responden bien al tratamiento con STS. Por otra parte, las células de glioblastoma con una expresión intacta de PME-1 son sensibles a la apoptosis mediada por STS.

Debido a que STS se ha documentado en la bibliografía como un inhibidor ampliamente específico de quinasas, no se considera que sea un agente terapéutico clínicamente relevante. Sin embargo, se sabe que ciertos derivados de STS son mucho más específicos y tienen menos efectos secundarios, y actualmente están en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes enfermedades. Así, se sustituyó STS por sus derivados, PKC412, K252a, RO-31-8220, GÖ 6976, SB 218078, Arciriaflavina A, K252c, Rebecamicina, Enzastaurina, UCN-01 o CEP-701 en el diseño experimental a diferentes concentraciones (Figura 5A). Sorprendentemente, se descubrió que PKC-412, K252a, UCN-01 y CEP-701 son capaces de inducir la apoptosis en células de glioblastoma con reducción de PME-1 a niveles aún mayores que la propia STS. SB 218078 indujo niveles moderados de apoptosis a una concentración mayor. Las células de glioblastoma que expresaban niveles intactos de PME-1 no respondieron a ninguno de los derivados de STS ensayados.

El ensayo de formación de colonias en células T98G mediante el uso de dos fármacos activos, PKC412 y K252a, también corrobora el hallazgo anterior (Figura 5B). Para evitar los efectos específicos de las líneas celulares, también se estudió la eficacia de fármacos sensibilizantes a la apoptosis, STS, PKC412 y K252a, en otras líneas celulares de glioblastoma U251MG y U87MG con reducción de PME-1. En todas las líneas celulares estudiadas, la reducción de PME-1 incrementó la actividad de destrucción celular de STS, PKC412, y K252a, aunque hubo diferencias dependientes del tipo celular en la eficacia de las combinaciones de tratamientos (Figuras 5C y 5D).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Turun yliopisto

5 <120> Método de selección de una terapia individualizada del cáncer de cerebro

<130> 2120221PC

<160> 40

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

15 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PME-1 siARN

20 <400> 1

ggaagugagu cuauaagca 19

<210> 2

<211> 19

25 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PME-1 siARN

30 <400> 2

ucauagagga agaagaaga 19

35 <210> 3

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> PME-1 siARN

<400> 3

45 aggucaagaa uccugaaga 19

<210> 4

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> siARN aleatorizado

<400> 4

55 guaacaauga gagcacggc 19

<210> 5

<211> 19

<212> ARN

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PME-1 siARN

65 <400> 5

ggaaggauc auagaggaa 19
 <210> 6
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 10 <400> 6
 ggccaaagcc uauggaau 19
 <210> 7
 15 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> PME-1 siARN
 <400> 7
 auguagaagu agagauga 19
 25 <210> 8
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> PME-1 siARN
 <400> 8
 35 ggucaagaau ccugaagau 19
 <210> 9
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> PME-1 siARN
 <400> 9
 45 cugcagaaac aauggcaaa 19
 <210> 10
 <211> 19
 <212> ARN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 55 <400> 10
 gcgaagucan ggugaaaca 19
 <210> 11
 <211> 19
 60 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 65 <400> 11

	cauggaagau guagaagua	19
	<210> 12	
	<211> 19	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> PME-1 siARN	
10	<400> 12	
	agaagaagaa gaugaggaa	19
	<210> 13	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> PME-1 siARN	
	<400> 13	
	gcgaaugggc ccuggaaga	19
25	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> PME-1 siARN	
	<400> 14	
	aggaagaaga agaagauga	19
35	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> PME-1 siARN	
	<400> 15	
	agauguagaa guagagaau	19
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> PME-1 siARN	
	<400> 16	
	ucuauaagca agaggaaaa	19
	<210> 17	
	<211> 19	
60	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> PME-1 siARN	
65	<400> 17	

aaucauagag gaagaagaa 19
 <210> 18
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 10 <400> 18
 gguuaagcc uccagauuu 19
 <210> 19
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 20 <400> 19
 caaacagugu gaaggaauu 19
 25 <210> 20
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> PME-1 siARN
 <400> 20
 35 ggagaauuga acuggcaaa 19
 <210> 21
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> PME-1 siARN
 <400> 21
 45 ucauagagga agaagaaga 19
 <210> 22
 <211> 19
 <212> ARN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 55 <400> 22
 gcuaaugaau ggaguguga 19
 <210> 23
 <211> 19
 60 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 65 <400> 23

ES 2 633 736 T3

cuuauagca ugcagaauu 19
 <210> 24
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 10
 <400> 24
 gaaugaaacu ggcaaggau 19
 <210> 25
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 20
 <400> 25
 aaugacau ggagaccaa 19
 25 <210> 26
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> PME-1 siARN
 <400> 26
 35 uggaagau agaguaga 19
 <210> 27
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> PME-1 siARN
 <400> 27
 45 aaggaucou agagaga 19
 <210> 28
 <211> 19
 <212> ARN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 55 <400> 28
 aaucuauagu ggaaggaau 19
 <210> 29
 <211> 19
 60 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PME-1 siARN
 65 <400> 29

ccaagaaaga ccauccaua 19

5 <210> 30
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> PME-1 siARN

<400> 30
caugauugau guuguagaa 19

15 <210> 31
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> PME-1 siARN

<400> 31
guggauagca ucacaagaa 19

25 <210> 32
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> PME-1 siARN

<400> 32
cauagaggaa gaagaagaa 19

35 <210> 33
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> PME-1 siARN

45 <400> 33
gaacaaaggu caagaaucc 19

<210> 34
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> PME-1 siARN

55 <400> 34
gaaucouaga ggaagaaga 19

60 <210> 35
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> PME-1 siARN

<400> 35
 acagugugaa ggaauuaca 19

5 <210> 36
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> PME-1 siARN

<400> 36
 ucuaugugg aaggaauca 19

15 <210> 37
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> PME-1 siARN

<400> 37
 gguacagcua uggaugcac 19

25 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> PME-1 shARN

<400> 38
 ctggtgtga tagattgat a 21

35 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> PME-1 shARN

<400> 39
 cccaggttaa atacagcca t 21

45 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> PME-1 shARN

<400> 40
 gcttatccaa tctcttctt a 21

55

REIVINDICACIONES

1. Un método de selección de una terapia de gliomas para un paciente que necesita tal terapia, en el que el método comprende

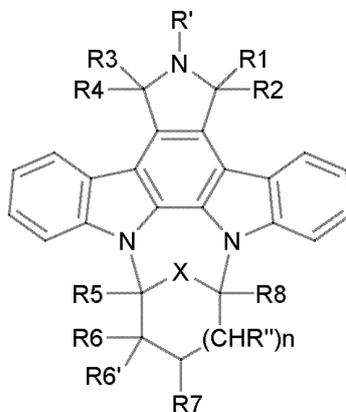
5 a) determinar el nivel de expresión de PME-1 en una muestra quirúrgica o de biopsia obtenida de un tejido cerebral enfermo;

b) usar los resultados obtenidos en la etapa a) como criterios para seleccionar la terapia de gliomas a la que es susceptible dicho paciente; en el que

10 la expresión incrementada de PME-1 indica que dicho paciente no es susceptible a la monoterapia con un derivado de estaurosporina (STS), pero dicho paciente es susceptible a una terapia de combinación con un derivado de STS y un agente de silenciamiento de PME-1;

mientras la expresión intacta de PME-1 indica que dicho paciente es susceptible a una terapia de gliomas con un derivado de STS;

en el que dicho derivado de STS tiene la Fórmula general (I):



15 en la que

R' es H o alquilo;

R1 y R2 son H o forman juntos oxo;

R3 y R4 son independientemente H, OH o forman juntos oxo;

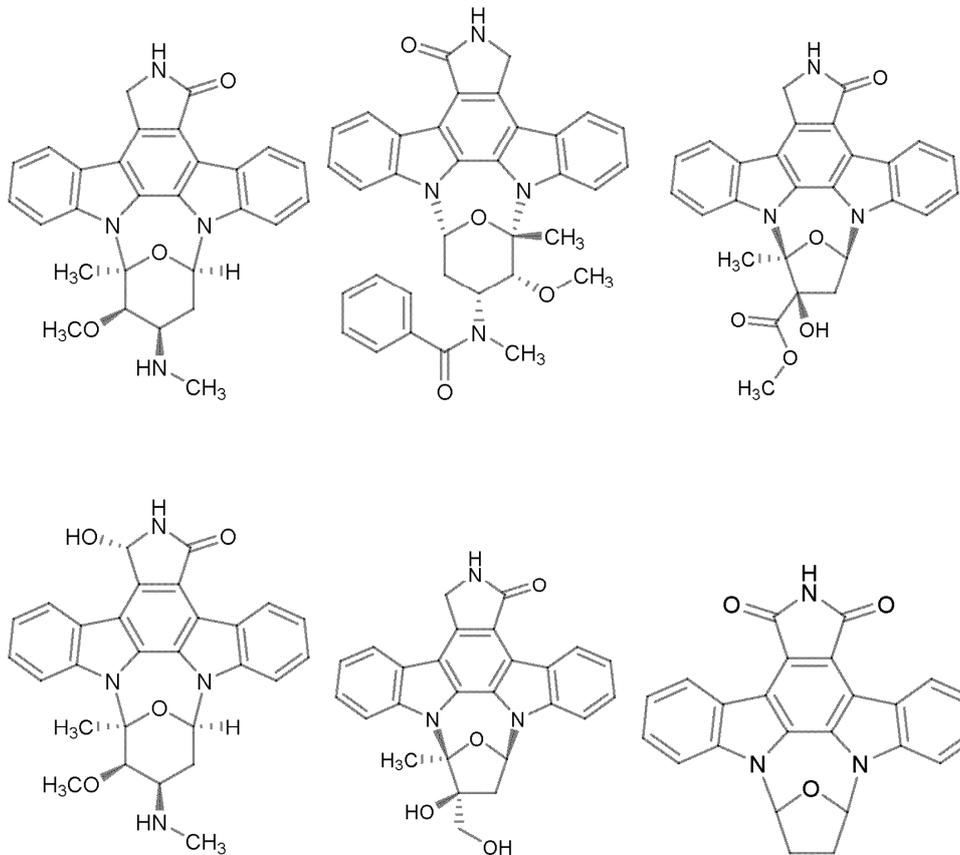
20 R5, R6, R6', R7, y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxialquilo, alcóxicarbonilo, o mono- y dialquilamino;

X es CH₂ u O; y

n es 0 o 1; y

25 en el que dicho agente de silenciamiento de PME-1 es una molécula de ARNi seleccionada de ARNs bicatenarios pequeños (dsARNs), ARNs de interferencia pequeños (siARNs), siARNs sustratos de Dicer (DsiARNs), precursores de microARN artificial (miARN), y ARNs de horquilla corta (shARNs).

2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho derivado de STS se selecciona del grupo que consiste en las estructuras siguientes:



3. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho paciente padece un glioma seleccionado de un grupo que consiste en astrocitoma, astrocitoma pilocítico juvenil, astrocitoma de grado bajo, astrocitoma anaplásico, glioblastoma, oligodendroglioma, y ependimoma.
- 5 4. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha molécula de ARNi se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N°:s 5 a 40.

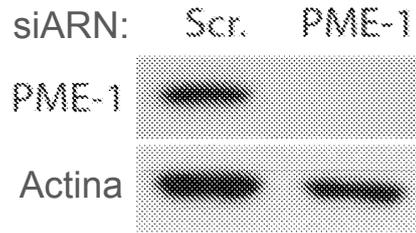


FIG 1A

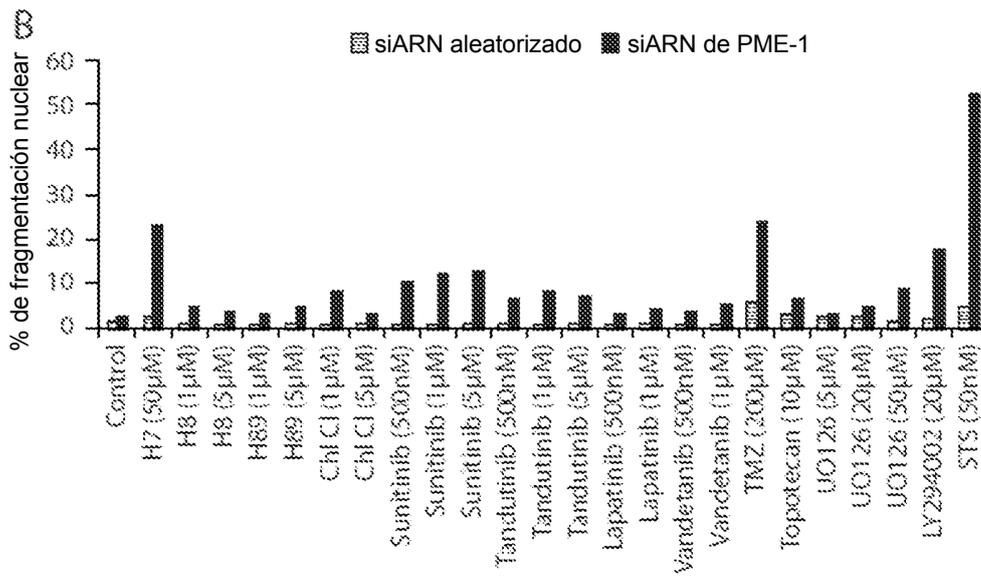


FIG 1B

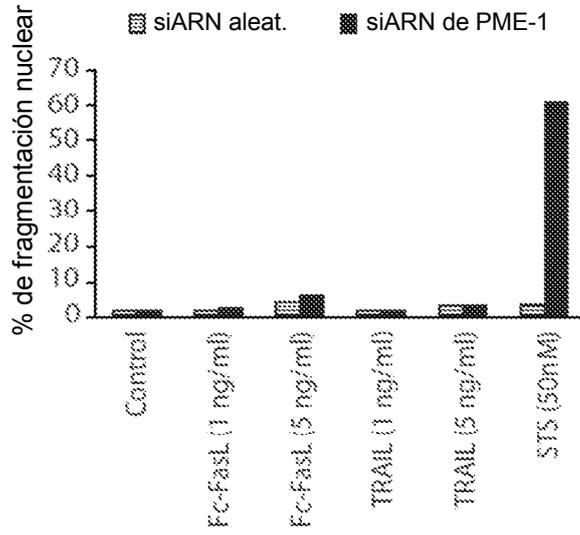


FIG 1C

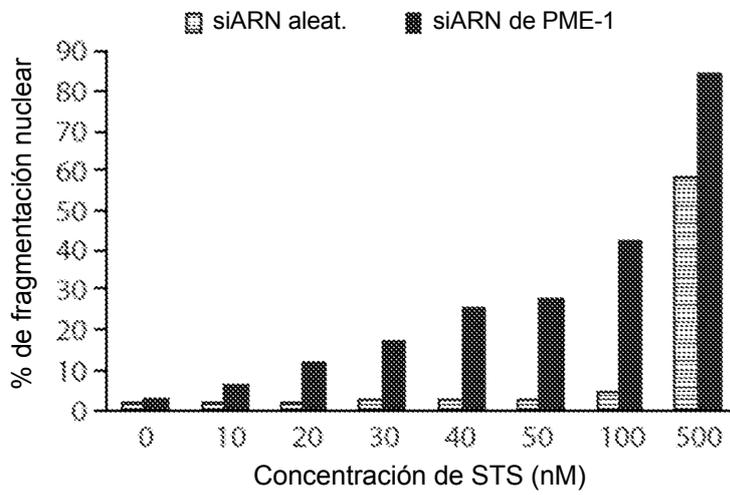


FIG 1D

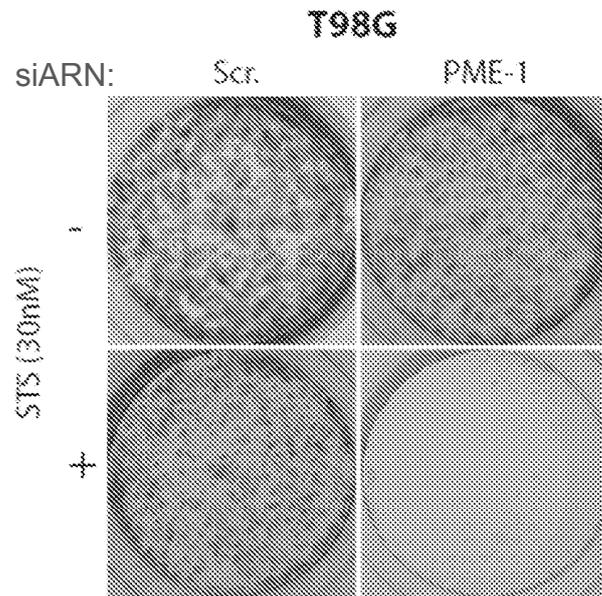


FIG 1E

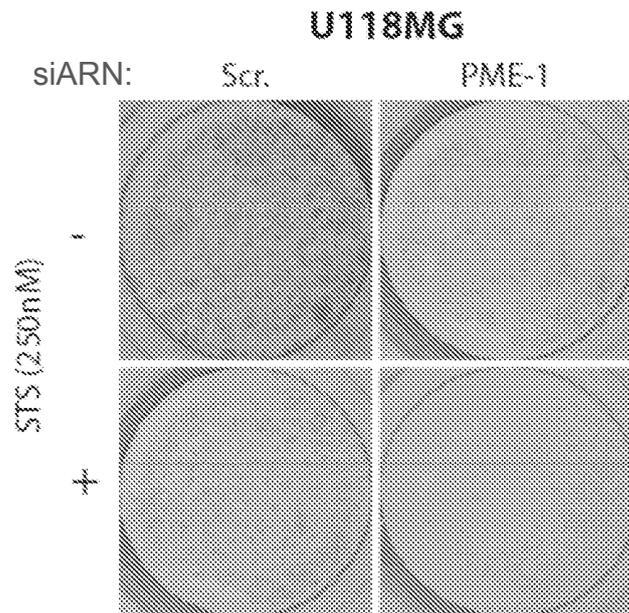


FIG 1F

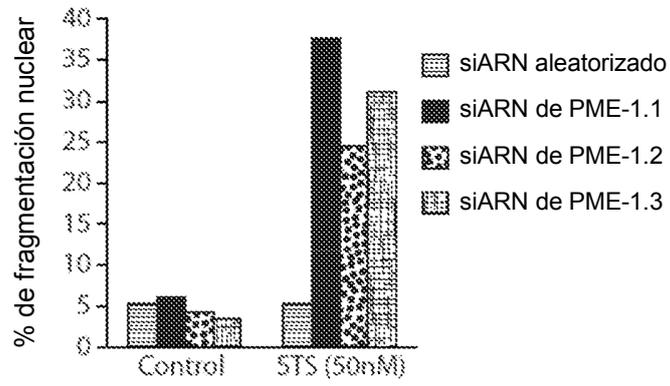


FIG 2A

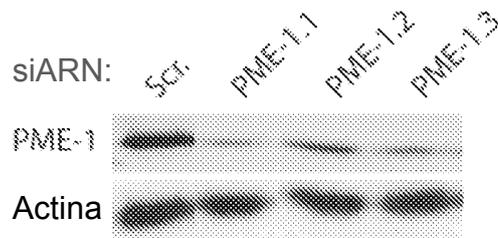


FIG 2B

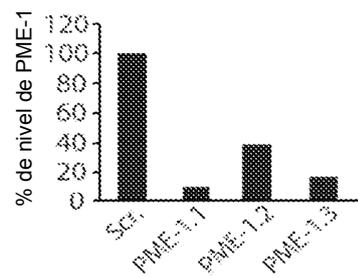


FIG 2C

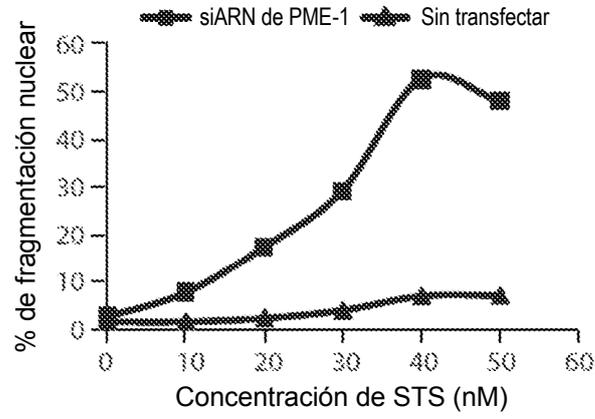


FIG 2D

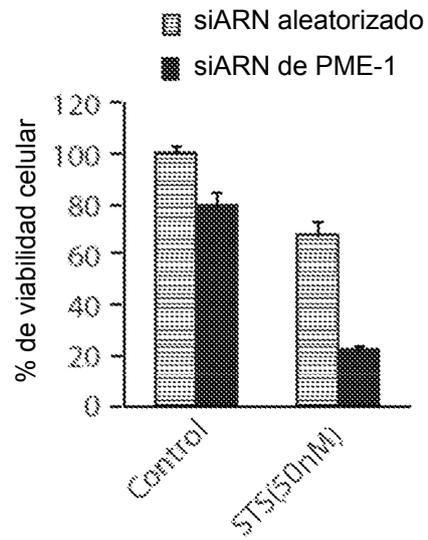


FIG 3A

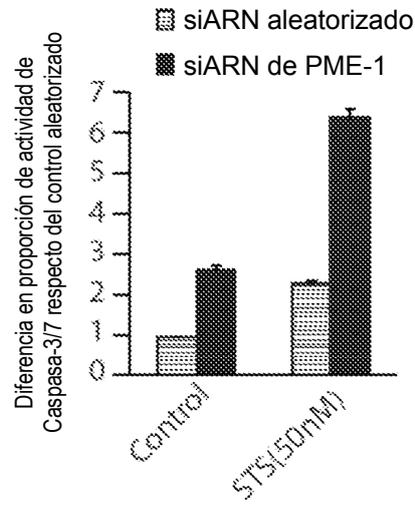


FIG 3B

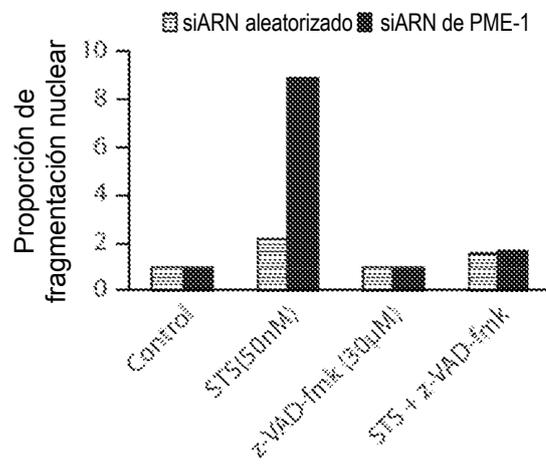


FIG 3C

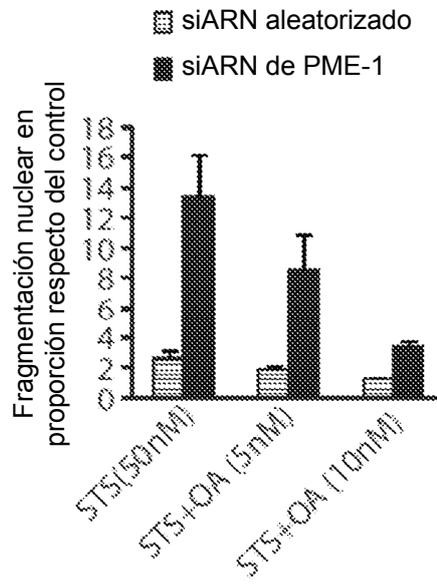


FIG 4A

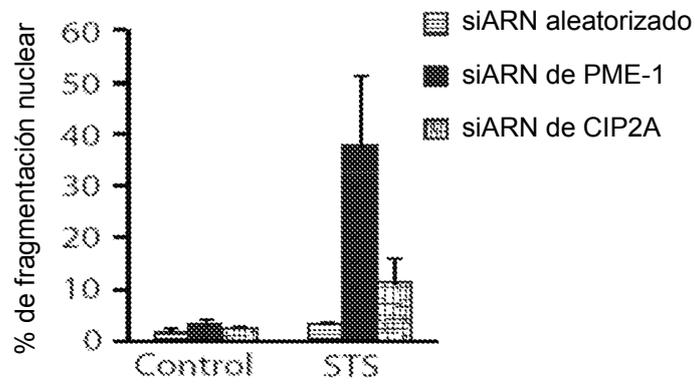


FIG 4B

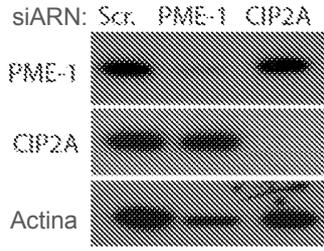


FIG 4C

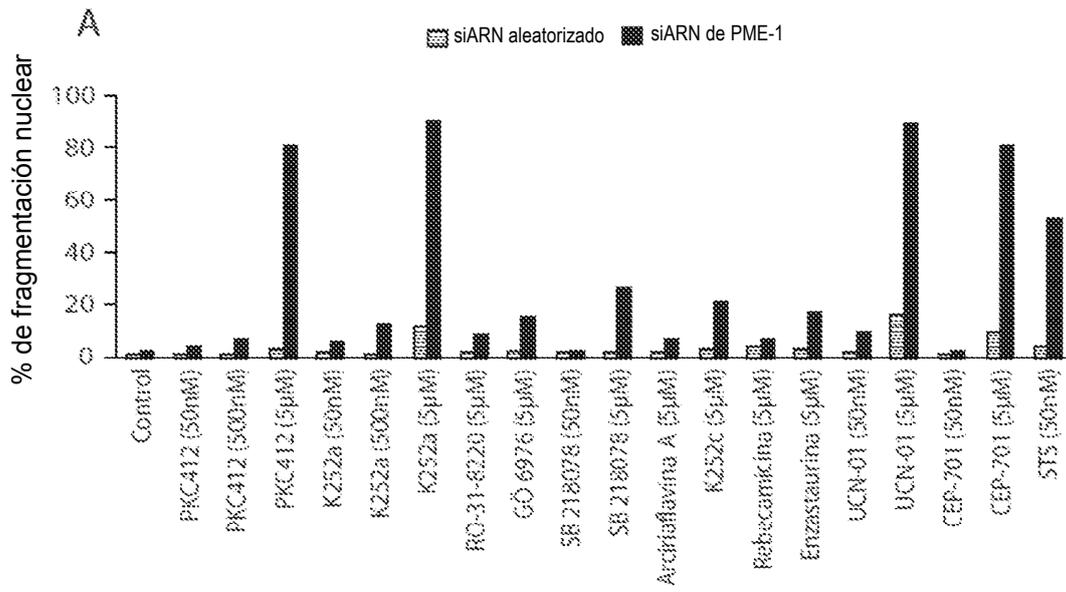


FIG 5A

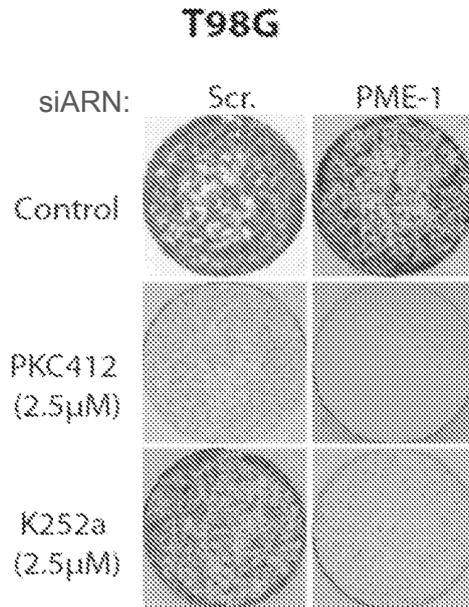


FIG 5B

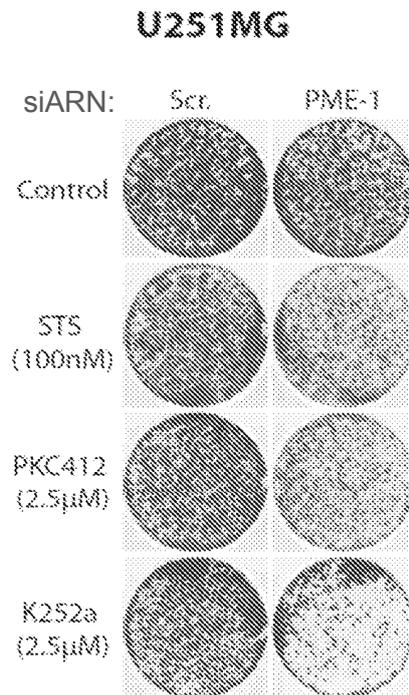


FIG 5C

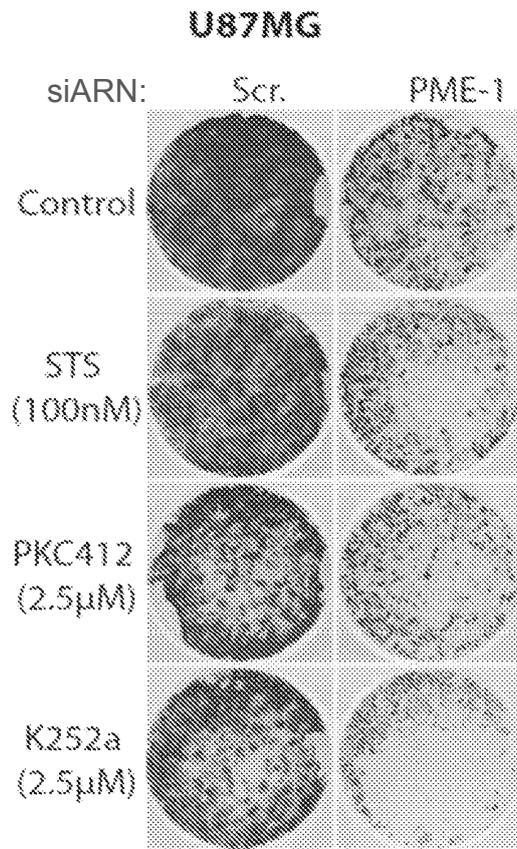


FIG 5D