

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 930**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2009 PCT/US2009/045406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09155025**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2009 E 09767337 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2315594**

54 Título: **Métodos de tratamiento de una enfermedad asociada a la cinesina meiótica**

30 Prioridad:

30.05.2008 US 57590 P

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

26.09.2017

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US**

72 Inventor/es:

PELLMAN, DAVID

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 633 930 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de una enfermedad asociada a la cinesina meiótica

5 Antecedentes de la invención

Los centrosomas desempeñan una función crucial en la segregación equitativa de cromosomas contribuyendo al ensamblaje del huso bipolar durante la mitosis (Doxsey, S. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:688-698). El estrecho control sobre la duplicación del centrosoma, limitándolo a una vez por ciclo celular, garantiza que las células normales entren en mitosis con dos centrosomas o centros de organización de microtúbulos (MTOC, *microtubule organizing centers*). El no poder controlar apropiadamente el número y la función de los centrosomas puede conducir a husos multipolares, a aneuploidía, a alteración de la polaridad celular y a fallos de divisiones celulares asimétricas (Heneen, W.K. (1970) *Chromosoma* 29:88-117; Nigg, E.A. (2002) *Nat Rev Cancer* 2:815-825).

15 El elevado número de centrosomas, frecuentemente denominado amplificación de centrosomas, es una característica común de cánceres sólidos y hematológicos. La amplificación de centrosomas se correlaciona con aneuploidía y comportamiento maligno en líneas de células tumorales, modelos de tumor de ratón y tumores humanos (D'Assoro, A.B. et al. (2002) *Breast Cancer Res Treat* 75: 25-34; Giehl, S. et al. (2005) *Leukemia* 19:1192-1197.; Levine, D.S. et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6427-6431; Lingle, W.L. et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2950-2955; Pihan, G.A. et al. (2003) *Cancer Res* 63:1398-1404). La mutación o regulación errónea de una variedad de supresores tumorales u oncogenes se correlaciona con la amplificación de centrosomas (Fukasawa, K. (2007) *Nat Rev Cancer* 7:911-924). La amplificación de centrosomas puede, en principio, surgir de varios tipos de errores de la división celular: duplicación en exceso de centrosomas, síntesis de novo de centrosomas, fusión celular o fallo de la citocinesis (Boveri, T. (1929) *The Origin of Malignant Tumors* (Baltimore: Williams and Wilkins); Ganem, N.J. et al. (2007) *Curr Opin Genet Dev* 17:157-162; Nigg, E.A. (2002) *Nat Rev Cancer* 2:815-825).

Es probable que la función de los centrosomas supernumerarios en la biología tumoral sea polifacética. Mientras que los múltiples centrosomas podrían facilitar la tumorigénesis promoviendo la aneuploidía y/o alterando la polaridad celular, también pueden imponer un coste de idoneidad al crecimiento de cánceres maduros debido a las posibilidades de mitosis multipolares. Para evitar este problema, muchas células cancerosas parecen tener mecanismos que suprimen las mitosis multipolares, siendo el mejor estudiado la agrupación de centrosomas supernumerarios en dos grupos que permiten una mitosis bipolar (Brinkley, B.R. (2001) *Trends Cell Biol* 11:18-21; Nigg, E.A. (2002) *Nat Rev Cancer* 2:815-825; Ring, D. et al. (1982) *J Cell Biol* 94:549-556).

35 La agrupación de centrosomas en células tumorales es incompletamente entendida, sin embargo, se espera que se base a un grado significativo en las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) y motores que organizan los polos del huso (Karsenti, E. y Vernos, I. (2001) *Science* 294:543-547; Nigg, E.A. (2002) *Nat Rev Cancer* 2:815-825). Por ejemplo, un trabajo reciente descubrió un requisito de dineína citoplásmica, un motor de microtúbulos dirigido al extremo menos (MT), y NuMA, una MAP asociada al huso, en la agrupación de centrosomas (Quintyne, N.J. et al. (2005) *Science* 307:127-129). La existencia de mecanismos que suprimen las mitosis multipolares abre la posibilidad de una estrategia terapéutica novedosa para cáncer: fármacos que interfieren con los mecanismos de agrupación de centrosomas podrían ser letales para células tumorales que contienen múltiples centrosomas, pero posiblemente ahorran células normales. Aunque varios fármacos, que incluye Taxol, pueden promover la mitosis multipolar, ninguno es específico para células con múltiples centrosomas (Chen, J.G. y Horwitz, S.B. (2002) *Cancer Res* 62:1935-1938; Rebacz, B. et al. (2007) *Cancer Res* 67:6342-6350).

Por consiguiente, todavía se necesita la identificación de componentes implicados en los mecanismos de agrupamiento de centrosomas en células tumorales.

50 Sumario de la invención

La presente invención identifica un componente clave implicado en el mecanismo de agrupamiento de centrosomas en células tumorales y demuestra que el desagrupamiento de centrosomas, por inhibición de este componente, puede inducir la muerte celular selectivamente en células con centrosomas supernumerarios. Este componente clave, la cinesina meiótica HSET (un miembro de la familia de cinesina-14), no es esencial para la mitosis en células normales, pero se demuestra en el presente documento que es esencial para la supervivencia de células cancerosas con centrosomas adicionales. Por consiguiente, la presente invención proporciona una diana para la destrucción selectiva de células que contienen centrosomas adicionales, tales como células cancerosas, mientras que se evita destruir células normales.

60 Así, en un aspecto, la invención se refiere a un agente de iARN que inhibe una cinesina meiótica HSET para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la cinesina meiótica, en el que la enfermedad o trastorno asociado a la cinesina meiótica es una enfermedad proliferativa celular o trastorno. En una realización preferida, la enfermedad o trastorno es una enfermedad de los centrosomas (por ejemplo, caracterizado por la presencia de centrosomas supernumerarios). En otra realización preferida, la enfermedad o trastorno es una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer o tumor maligno. La cinesina meiótica es un miembro de la familia

de cinesina-14, HSET. En una realización, el agente inhibe la actividad de ATPasa de la cinesina. En otra realización, el agente inhibe la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina. El agente puede administrarse, por ejemplo, por vía oral o por vía parenteral.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un agente de iARN que inhibe una cinesina meiótica HSET para su uso en inhibir el crecimiento de una célula tumoral en la que la proliferación celular está asociada a una cinesina meiótica HSET, poniendo en contacto la célula tumoral con el agente de iARN. En una realización preferida, la célula tumoral comprende centrosomas supernumerarios. La cinesina meiótica es un miembro de la familia de cinesina, HSET. En una realización, el agente inhibe la actividad de ATPasa de la cinesina. En otra realización, el agente inhibe la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina. La célula tumoral puede ponerse en contacto con el agente, por ejemplo, cultivando la célula tumoral con el agente o inyectando directamente el agente en un tumor que contiene la célula tumoral o administrando el agente a un sujeto que lleva un tumor que contiene la célula tumoral.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un agente de iARN que inhibe una cinesina meiótica HSET para su uso en inhibir el crecimiento de una célula en la que la proliferación celular está asociada a una cinesina meiótica HSET, poniendo en contacto la célula con el agente de iARN. En una realización preferida, la célula contiene centrosomas supernumerarios. La cinesina meiótica es un miembro de la familia de cinesina, HSET. En una realización, el agente inhibe la actividad de ATPasa de la cinesina. En otra realización, el agente inhibe la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina.

20 En otro aspecto más, la invención se refiere a un método de identificación de un compuesto que inhibe actividad de una cinesina meiótica HSET, comprendiendo el método proporcionar una composición indicadora que comprende la cinesina meiótica HSET; poner en contacto la composición indicadora con un compuesto de prueba; y determinar actividad de la cinesina meiótica HSET en presencia del compuesto de prueba, en el que la actividad de la cinesina meiótica HSET se determina midiendo

- a) la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina; o
- b) la expresión de ARNm de HSET o proteína,

30 en el que la reducción de actividad de la cinesina meiótica HSET en presencia del compuesto de prueba, en comparación con la actividad de la cinesina meiótica HSET en ausencia del compuesto de prueba, identifica al compuesto de prueba como un compuesto que inhibe la actividad de una cinesina meiótica HSET.

35 En una realización preferida, la composición indicadora se pone en contacto con cada miembro de una biblioteca de compuestos de prueba y se seleccionan uno o más compuestos de prueba dentro de la biblioteca que inhiben la actividad de la cinesina meiótica HSET.

40 En una realización, la actividad de la cinesina meiótica HSET se determina midiendo la actividad de ATPasa de la cinesina. En otra realización, la actividad de la cinesina meiótica HSET se determina midiendo la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina. En otra realización más, la actividad de la cinesina meiótica HSET se determina midiendo la expresión de ARNm de HSET o proteína.

45 La divulgación también se refiere a compuestos aislados identificados por los métodos de cribado de la invención.

50 La descripción también se refiere a un método de selección de un sujeto con un tumor para el tratamiento con un agente que inhibe una cinesina meiótica, comprendiendo el método (i) obtener una muestra de células tumorales del sujeto, y (ii) determinar el número de centrosomas en la muestra de células tumorales, en el que la presencia de centrosomas supernumerarios en la muestra de células tumorales selecciona al sujeto para el tratamiento con un agente que inhibe una cinesina meiótica. Preferentemente, la cinesina meiótica es un miembro de la familia de cinesina, lo más preferentemente HSET. Preferentemente, al menos el 50 % de las células tumorales en la muestra contienen centrosomas supernumerarios, más preferentemente al menos el 75 % de las células tumorales en la muestra contienen centrosomas supernumerarios e incluso más preferentemente al menos el 90 % de las células tumorales en la muestra contienen centrosomas supernumerarios.

55 Breve descripción de las figuras

60 La Figura 1 muestra el esquema para el cribado de iARN de genoma completo en células S2 de *Drosophila* para identificar genes cuya inactivación conduce a husos multipolares (desagrupamiento de centrosomas).

La Figura 2 es un gráfico de barras del porcentaje de células S2 con husos anormales tras la inactivación por iARN de EGFP o Mad2 solo, o inactivación por iARN de EGFP o Mad2 más tratamiento con MG132.

65 La Figura 3 es un gráfico de barras del porcentaje de células S2 con husos anormales tras el tratamiento con latrunculina (LatA), citocalasina D o concanavalina-A (Con-A).

La Figura 4 es un gráfico de barras del porcentaje de células con husos multipolares en células MCF-7, MDA-231, MMECS 4N o N1E-115 tras el tratamiento con DMSO, LatA o DCB

5 La Figura 5 es una transferencia Western que muestra el agotamiento de HSET después de tres días de ARNip en células MDA-231 y MCF-7.

La Figura 6 es una transferencia Western que muestra el agotamiento de Mio10 después de tres días de ARNip en células MDA-231 y MCF-7.

10 La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células con husos multipolares en células MCF-7 o MDA-231 tras el tratamiento con ARNip de HSET o Mio10.

15 La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células mitóticas con husos multipolares tras el tratamiento con ARNip de HSET o Mio10, ambos con (+) o sin (-) LatA.

La Figura 9 es gráficos de barras que muestran la pérdida de viabilidad celular e inhibición de la formación de colonias por células N1E-115 después de 6 días de tratamiento con ARNip de HSET.

20 La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra la muerte celular inducida por iARN de HSET en diversas líneas de células cancerosas en proporción a la fracción de células con centrosomas adicionales.

Descripción detallada

25 La invención es como se explica en las reivindicaciones.

La presente invención identifica un componente clave implicado en el mecanismo de agrupamiento de centrosomas en células tumorales. La presente invención demuestra además que el desagrupamiento de centrosomas puede inducir muerte celular selectivamente en células con centrosomas supernumerarios. En al menos una realización, la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento que la cinesina meiótica HSET, un motor de cinesina normalmente no esencial, es requerido para la viabilidad de células que contienen centrosomas adicionales. Múltiples centrosomas en células tumorales crean el potencial de divisiones multipolares que pueden conducir a aneuploidía y muerte celular. Sin embargo, muchas células cancerosas se dividen satisfactoriamente debido a mecanismos que suprimen mitosis multipolares. Un cribado de iARN de genoma completo en células S2 de *Drosophila* y un análisis secundario en células cancerosas definió mecanismos que suprimen mitosis multipolares. En particular, se ha mostrado ahora que la cinesina meiótica HSET es esencial para la viabilidad de ciertas células cancerosas que contienen centrosomas adicionales, con inhibición de HSET que conduce a la inhibición de la viabilidad celular (véase en los ejemplos particulares 6 y 8 en el presente documento). Así, el hallazgo descrito en el presente documento que el motor dirigido al extremo menos HSET es esencial para agrupar centrosomas adicionales proporciona una nueva estrategia terapéutica: el bloquear el agrupamiento de centrosomas y promover las mitosis multipolares para inducir selectivamente muerte en tumores con una alta proporción de células que contienen múltiples centrosomas. La presente invención proporciona ensayos para identificar agentes que modulan la actividad de una cinesina meiótica, tal como HSET, además de métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a actividad de cinesina meiótica, y métodos de selección de sujetos para el tratamiento con un inhibidor de cinesina meiótica.

45 De manera que la invención pueda ser más fácilmente entendida, se definen primero ciertos términos.

50 El término "cinesina" se refiere a una clase de proteínas motoras encontradas en células eucariotas que son capaces de moverse a lo largo de los microtúbulos accionadas por la hidrólisis de ATP. El término "cinesina meiótica" se refiere a cinesinas que participan en, y necesarias para, la función celular de la meiosis.

55 El término "miembro de la familia de cinesina-14" se refiere a una cinesina que es un miembro de la familia de cinesina, familia que comparte un dominio motor del extremo C común que se diferencia de otras proteínas cinesinas. La familia de cinesina también se conoce en la técnica como las cinesinas del extremo C. Ejemplos no limitantes de miembros de la familia de cinesina-14 incluyen proteínas HSET, CHO2, KIFC2 y KIFC3 de *Homo sapiens*, proteínas HSET y KIFC2 de *Mus musculus*, proteína Ncd de *Drosophila melanogaster* y proteína Kar3 de *Saccharomyces cerevisiae*.

60 El término "HSET" se refiere a un miembro de la familia de cinesina-14 también conocido en la técnica como KIFC1 (miembro C1 de la familia de cinesina). La secuencia de ARNm y de proteínas de HSET humana están disponibles en los N.º de acceso de Genbank NM_002263 y NP_002254, respectivamente. La secuencia de ARNm y de proteínas de HSET de ratón están disponibles en los N.º de acceso de Genbank NM_053173 y NP_444403, respectivamente. Una secuencia de HSET humana puede diferenciarse de HSET humana de número de acceso de GenBank NP_002254 por tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y la HSET tiene sustancialmente la misma función biológica que la HSET humana de número de acceso de GenBank NP_002254. Una secuencia de HSET humana particular generalmente será al menos el 90 % idéntica en la

secuencia de aminoácidos a HSET humana, tal como al número de acceso de GenBank NP_002254, y contiene restos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos como que es humana cuando se compara con secuencias de aminoácidos de HSET de otras especies (por ejemplo, murinas). En ciertos casos, una HSET humana puede ser al menos el 95 %, o incluso al menos el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica en secuencia de aminoácidos a HSET humana, tal como al número de acceso de GenBank NP_002254. En ciertas realizaciones, una secuencia de HSET humana mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de HSET humana, tal como al número de acceso de GenBank NP_002254. En ciertas realizaciones, la HSET humana puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos de la secuencia de HSET humana, tal como al número de acceso de GenBank NP_002254.

El término "enfermedad o trastorno asociado a la cinesina meiótica" pretende referirse a una enfermedad o trastorno cuya patogénesis requiere la actividad de una cinesina que se sabe que funciona en la meiosis.

El término "enfermedad o trastorno autosómico" pretende referirse a una enfermedad o trastorno cuya patogénesis está asociada a un cromosoma no sexual.

El término "enfermedad o trastorno centrosómico" pretende referirse a una enfermedad o trastorno cuya patogénesis está asociada a alteración en el número o actividad de centrosomas.

El término "centrosomas supernumerarios" pretende referirse a más del número usual o prescrito de centrosomas en una célula, normalmente superior al número usual de dos centrosomas en una célula.

El término "enfermedad o trastorno proliferativo celular" pretende referirse a una enfermedad o a un trastorno cuya patogénesis está asociada a proliferación celular alterada o aberrante.

Como se usa en el presente documento, un agente o compuesto que "inhibe la actividad" de una cinesina meiótica, tal como HSET, pretende referirse a un agente o compuesto que reduce, o disminuye, o mengua la actividad de la cinesina meiótica, inhibición que puede ser parcial o completa, y en la que tal "actividad" puede ser, por ejemplo, expresión del ARNm que codifica la cinesina en una célula, expresión del nivel de proteína de la cinesina en una célula, o expresión de la actividad enzimática u otras actividades biológicas de la cinesina, incluyendo ejemplos de tales actividades enzimáticas y otras biológicas, pero no limitándose a, actividad de ATPasa y actividad de unión de microtúbulos.

El término "agente" incluye cualquier sustancia, molécula, elemento, compuesto, entidad, o una combinación de los mismos. Incluye, pero no se limita a, por ejemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, y similares. Puede ser un producto natural, un compuesto sintético, o un compuesto químico, o una combinación de dos o más sustancias. A menos que se especifique de otro modo, los términos "agente", "sustancia" y "compuesto" pueden usarse indistintamente.

Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "sentido" que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la hebra codificante de una molécula de ADNc bicatenario, complementaria a una secuencia de ARNm o complementaria a la hebra codificante de un gen. Por consiguiente, un ácido nucleico antisentido puede unirse por hidrógeno a un ácido nucleico sentido.

Como se usa en el presente documento, un "agente de iARN" se refiere a un agente, tal como una molécula de ácido nucleico, que media en la interferencia por ARN. Interferencia por ARN (iARN) es una técnica de silenciamiento génico dirigido post-transcripcional que usa ARN bicatenario (ARNbc) para degradar ARN mensajero (ARNm) que contiene la misma secuencia que el ARNbc (véanse, por ejemplo, Sharp, P. A. y Zamore, P. D. (2000) *Science* 287:2431-2432; Zamore, P. D., et al. (2000) *Cell* 101:25-33; Tuschl, T. et al. (1999) *Genes Dev.* 13:3191-3197; Cottrell T.R., y Doering T.L. (2003) *Trends Microbiol.* 11:37-43; Bushman F. (2003) *Mol Therapy* 7:9-10; McManus M.T. y Sharp P.A. (2002) *Nat Rev Genet.* 3:737-47). El proceso se produce cuando una ribonucleasa endógena escinde el ARNbc más largo en más corto, por ejemplo, ARN de 21 o 22 nucleótidos de longitud, llamados ARN interferentes pequeños o ARNip. Los segmentos de ARN más pequeños median entonces en la degradación de los ARNm diana. Kits para la síntesis de ARNip están comercialmente disponibles, por ejemplo de New England Biolabs, Dharmacon o Ambion. Así, en una realización, un "agente de iARN" es una molécula de ácido nucleico que es una molécula de ARNip. Otros ejemplos de moléculas de ácidos nucleicos que pueden usarse para silenciar la expresión génica mediante interferencia por ARN incluyen ARN de horquilla pequeña (ARNhp) y microARN (miARN). Por consiguiente, el término "agente de iARN" también pretende englobar moléculas tales como ARNhp, miARN y similares que pueden usarse para silenciar la expresión génica por interferencia por ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Tratamiento de enfermedades o trastornos

En un aspecto, la invención se refiere a un agente para tratar enfermedades o trastornos. En particular, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la cinesina meiótica. El método comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento del mismo un agente que inhibe una cinesina meiótica de forma que se logre el tratamiento de la enfermedad o trastorno.

La enfermedad o trastorno es una enfermedad proliferativa celular o trastorno. Lo más preferentemente, la enfermedad o trastorno es un cáncer, tumor u otro tumor maligno. Preferentemente, el cáncer, tumor u otro tumor maligno es uno en el que el cáncer, tumor o células malignas comprenden centrosomas supernumerarios. Más preferentemente, al menos el 50 % del cáncer, tumor o células malignas comprenden centrosomas supernumerarios, incluso más preferentemente al menos el 75 % del cáncer, tumor o células malignas comprenden centrosomas supernumerarios, e incluso más preferentemente al menos el 90 % del cáncer, tumor o células malignas comprenden centrosomas supernumerarios. Ejemplos no limitantes de cánceres que pueden tratarse según los métodos de la invención incluyen mama, colon, pulmón, próstata, ovario, pancreático, cerebro, estómago, renal, hepático, hueso, piel, leucemias, linfomas, mieloma múltiple y melanoma.

Otras enfermedades o trastornos asociados a la acumulación de centrosomas supernumerarios incluyen infección por el virus del papiloma humano (VPH), que incluye neoplasias cervicales asociadas al VPH (véase, por ejemplo, Duensing, S. y Munger, K. (2002) *Oncogene* 21:6241-6248),

La cinesina meiótica es un miembro de la familia de cinesina-14; la cinesina meiótica es HSET.

El agente es un agente de iARN, tal como un ARNip. Como se describe en detalle en los Ejemplos 6 y 8, se demostró que los inhibidores de ARNip de HSET humana reducían la viabilidad de varias líneas de células cancerosas diferentes. Ejemplos no limitantes de moléculas de ácidos nucleicos que pueden funcionar como inhibidores de ARNip de HSET humana incluyen los oligonucleótidos mostrados en SEQ ID NOs: 1-4. Tales agentes pueden identificarse, por ejemplo, usando ensayos de cribado para inhibidores de HSET como se describen en detalle en el presente documento. En una realización, el agente inhibe la actividad de ATPasa de la cinesina. En otra realización, el agente inhibe la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina.

Un agente de la invención normalmente se administra al sujeto en una composición farmacéutica. La administración es por cualquier vía adecuada para realizar el tratamiento deseado. Por ejemplo, en una realización, el agente se administra por vía oral. En otra realización, el agente se administra por vía parenteral.

La composición farmacéutica normalmente incluye el agente formulado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el agente activo puede recubrirse en un material para proteger el agente de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el agente.

La composición farmacéutica puede incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, además de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, además de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y

mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y usando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, arriba, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos en las composiciones, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. Adicionalmente, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas deben ser normalmente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una disolución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de éstos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son: secado al vacío y secado por congelación (liofilización), que dan un polvo del principio activo junto a cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual, variará dependiendo del sujeto a tratar y del modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cada cien por ciento, esta cantidad oscilará de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el setenta por ciento, más preferentemente de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el treinta por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las pautas de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, puede administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la presente divulgación viene dictada por, y es directamente dependiente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de preparación de composiciones de un compuesto activo tal para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variarse de manera que se obtenga una cantidad del principio activo que sea eficaz para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sea tóxica para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleadas o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, estado general de salud e historia médica anterior del paciente que se trata, y factores similares conocidos en el campo médico.

Una composición farmacéutica puede administrarse por una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la materia. Como apreciará un experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, raquídea u otras vías parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La expresión "administración parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o, generalmente, son conocidos para aquellos expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la materia. Por ejemplo, una composición terapéutica puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en las patentes de EE.UU. N° 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: patente de EE.UU. N° 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; patente de EE.UU. N° 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para la administración de medicamentos a través de la piel; patente de EE.UU. N° 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; patente de EE.UU. N° 4.447.224, que divulga un equipo de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; patente de EE.UU. N° 4.439.196, que divulga un sistema de suministro osmótico de fármacos que tiene múltiples compartimientos de cámaras; y patente de EE.UU. N° 4.475.196, que divulga un sistema de suministro osmótico de fármacos. Estas patentes se incorporan en el presente documento por referencia. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos para aquellos expertos en la materia.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que el agente terapéutico atraviese la BHE (si se desea), puede formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que son transportados selectivamente a células u órganos específicos, potenciándose así el suministro dirigido del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Restos de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.416.016 de Low et al.), manósidos (Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A surfactante (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p 120 (Schreier et al (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véanse también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Inhibición del crecimiento celular o proliferación

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente para su uso en inhibir el crecimiento celular como se explica en las reivindicaciones. Por ejemplo, la invención proporciona un agente para inhibir el crecimiento de una célula tumoral en la que la proliferación celular está asociada a una cinesina meiótica, que comprende poner en contacto la célula tumoral con un agente que inhibe una cinesina meiótica de forma que el crecimiento de la célula tumoral se inhiba. Preferentemente, la célula tumoral comprende centrosomas supernumerarios. La cinesina meiótica es un miembro de la familia de cinesina-14, HSET. El agente es un agente de iARN. En una realización, el agente inhibe la actividad de ATPasa de la cinesina. En otra realización, el agente inhibe la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina.

La célula tumoral puede ponerse en contacto con el agente, por ejemplo, cultivando la célula tumoral con el agente. Adicionalmente o alternativamente, la célula tumoral puede ponerse en contacto con el agente inyectando directamente el agente en un tumor que contiene la célula tumoral. Adicionalmente o alternativamente, la célula

tumoral puede ponerse en contacto con el agente administrando el agente a un sujeto que lleva un tumor que contiene la célula tumoral.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente para su uso en inhibir la proliferación de una célula en la que la proliferación celular está asociada a una cinesina meiótica, que comprende poner en contacto la célula con un agente que inhibe una cinesina meiótica tal que se logre la inhibición de la proliferación celular. Preferentemente, la célula contiene centrosomas supernumerarios. La cinesina meiótica es un miembro de la familia de cinesina-14, HSET. El agente es un agente de iARN. En una realización, el agente inhibe la actividad de ATPasa de la cinesina. En otra realización, el agente inhibe la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina.

La célula puede ponerse en contacto con el agente, por ejemplo, cultivando la célula con el agente. Adicionalmente o alternativamente, la célula puede ponerse en contacto con el agente inyectando directamente el agente en un tumor que contiene la célula. Adicionalmente o alternativamente, la célula puede ponerse en contacto con el agente administrando el agente a un sujeto que lleva la célula.

Métodos de cribado

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos de identificación de los compuestos que inhiben la actividad de una cinesina meiótica, tal como HSET como se explica en las reivindicaciones. Por ejemplo, la invención proporciona un método de identificación de un compuesto que inhibe la actividad de una cinesina meiótica HSET, comprendiendo el método

proporcionar una composición indicadora que comprende la cinesina meiótica HSET;
poner en contacto la composición indicadora con un compuesto de prueba; y
determinar la actividad de la cinesina meiótica HSET en presencia del compuesto de prueba, en el que la reducción de la actividad de la cinesina meiótica HSET en presencia del compuesto de prueba, en comparación con la actividad de la cinesina meiótica HSET en ausencia del compuesto de prueba, identifica el compuesto de prueba como un compuesto que inhibe la actividad de una cinesina meiótica HSET.

La composición indicadora puede ser, por ejemplo, una célula que contiene (es decir, expresa) HSET o una composición sin células que contiene HSET. Si la composición indicadora es una célula que contiene (es decir, expresa) HSET, puede ser una célula que expresa naturalmente HSET o una célula que ha sido manipulada (por ejemplo, por técnicas de ADN recombinante convencionales) para expresar o expresar en exceso HSET. Células que expresan naturalmente HSET incluyen, pero no se limitan a, las líneas de células cancerosas MDA-231, MMEDX 4N y N1E-115, además de otras líneas celulares descritas en los ejemplos. Para manipular una línea celular para que exprese HSET humana, el ADNc de HSET humana (que tiene la secuencia expuesta en N° de acceso de GenBank NM_002263) puede obtenerse por métodos convencionales (por ejemplo, amplificación por PCR), insertarse en un vector de expresión y transfectarse en una célula hospedadora, usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Para obtener HSET en una composición sin células, HSET puede purificarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, DeLuca, J.G. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:28014-28021 describen la purificación de HSET humana de células HeLa. Se han descrito en la materia anticuerpos anti-HSET que pueden usarse para purificar HSET por técnicas de inmunofinidad convencionales.

La etapa del método de "poner en contacto", puede comprender, por ejemplo, la incubación del compuesto de prueba con una célula que contiene (es decir, expresa) HSET o la incubación del compuesto de prueba con una composición sin células que contiene HSET.

La etapa de "determinar la actividad de la cinesina meiótica HSET" puede llevarse a cabo usando uno o más de una variedad de posibles "lecturas". Por ejemplo, en una realización, la actividad de HSET se determina midiendo niveles de ARNm de HSET en una célula que expresa HSET, en la que un compuesto de prueba es un inhibidor de la actividad de HSET si reduce el nivel de expresión de ARNm de HSET en comparación con el nivel en ausencia de los compuestos de prueba. Metodologías para medir los niveles de ARNm de HSET están bien establecidas en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Northern y amplificación por métodos de PCR. En otra realización, la actividad de HSET se determina midiendo niveles de proteína de HSET en una célula que expresa HSET, en la que un compuesto de prueba es un inhibidor de la actividad de HSET si reduce el nivel de expresión de la proteína HSET en comparación con el nivel en ausencia de los compuestos de prueba. Metodologías para medir los niveles de proteína HSET están bien establecidas en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Western y métodos de inmunoprecipitación.

En aún otras realizaciones, la actividad de HSET se determina midiendo una o más actividades enzimáticas o biológicas de HSET. Por ejemplo, se ha demostrado que HSET purificada produce el deslizamiento de microtúbulos cuando los microtúbulos estabilizados con Taxol se ponen en contacto con HSET purificada (véase DeLuca, J.G. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:28014-28021). Así, en una realización, el efecto de un compuesto de prueba sobre el deslizamiento de microtúbulos mediado por HSET *in vitro* puede determinarse, en comparación con el deslizamiento de microtúbulos mediado por HSET en ausencia del compuesto de prueba, para así determinar el efecto del compuesto de prueba sobre la actividad de HSET.

Adicionalmente o alternativamente, puede determinarse el efecto de un compuesto de prueba sobre la actividad de ATPasa de HSET. Por ejemplo, DeBonis, S. et al. (2004) Mol. Cancer The. 3:1079-1090 describen un ensayo de ATPasa activada por microtúbulos usado para identificar inhibidores de la cinesina mitótica Eg5. Similarmente, un ensayo de ATPasa activada por microtúbulos tal puede usarse con HSET purificada para determinar el efecto de un compuesto de prueba sobre la actividad de ATPasa de HSET. Así, en una realización, la actividad de la cinesina meiótica HSET se determina midiendo la actividad de ATPasa de la cinesina.

Otras actividades biológicas de HSET que pueden usarse como "lecturas" en la determinación del efecto de un compuesto de prueba sobre la actividad de HSET incluyen, pero no se limitan a, actividad de unión de microtúbulos y actividad de agrupamiento de centrosomas. Así, en otras realizaciones, la actividad de la cinesina meiótica HSET se determina midiendo la actividad de unión de microtúbulos o la actividad de agrupamiento de centrosomas de la cinesina.

Se ha descubierto que la expresión en exceso del gen HSET en células conduce a la detención del crecimiento y muerte celular. Por consiguiente, la invención también proporciona ensayos basados en células para determinar el efecto de un compuesto de prueba tras la detención del crecimiento inducido por HSET y muerte celular, y así identificar moduladores (por ejemplo, inhibidores) de HSET. Generalmente, estos ensayos incluyen las etapas de: (a) proporcionar una célula indicadora que comprende un vector de expresión recombinante que comprende un gen HSET operativamente unido a un promotor, en condiciones por las que dicho gen HSET se expresa en dicha célula indicadora; (b) poner en contacto dicha célula indicadora con un compuesto de prueba; y (c) determinar el efecto del compuesto de prueba sobre la detención del crecimiento inducido por HSET y muerte celular, en el que la atenuación de la detención del crecimiento inducida por HSET y la muerte celular en presencia del compuesto de prueba, en comparación con la detención del crecimiento inducida por HSET y la muerte celular en ausencia del compuesto de prueba, identifica el compuesto de prueba como un compuesto que inhibe la actividad de la cinesina meiótica, HSET. En una realización, el promotor es un promotor inducible. Se considera cualquier sistema de promotor inducible reconocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, un sistema inducible por ecdisona (véase, por ejemplo, Wakita et al., 2001, Biotechniques 31:414). Metodologías para medir la proliferación celular y la viabilidad celular son muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Wilson, A. P., Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach, 3rd ed. (ed. Masters, J. R. W.) Oxford University Press: Oxford 2000, Vol. 1; y Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Meth. 1983, 65, 55-63.).

En una realización preferida, una biblioteca de compuestos se criba en el ensayo de cribado de la invención para identificar compuestos dentro de la biblioteca que presenta la capacidad de inhibir la actividad de HSET. Así, en una realización preferida, la composición indicadora descrita anteriormente se pone en contacto con cada miembro de una biblioteca de compuestos de prueba y se seleccionan uno o más compuestos de prueba dentro de la biblioteca que inhiben la actividad de la cinesina meiótica HSET.

En otro aspecto más, la invención se refiere a compuestos aislados identificados por los métodos de cribado de la invención.

Métodos de selección de sujetos

En otro aspecto, la descripción se refiere a métodos de selección de sujetos para el tratamiento con un agente que inhibe una cinesina meiótica, tal como HSET. Como se demuestra en el presente documento, la inhibición de la actividad de HSET reduce selectivamente la viabilidad de células, tales como células cancerosas, que contienen centrosomas adicionales. Por consiguiente, sujetos que llevan un tumor que contiene células con centrosomas adicionales son de interés particular para el tratamiento con un agente que inhibe una cinesina meiótica, tal como HSET. Así, en otro aspecto, la descripción proporciona un método de selección de un sujeto con un tumor para el tratamiento con un agente que inhibe una cinesina meiótica, comprendiendo el método (i) obtener una muestra de células tumorales del sujeto, y (ii) determinar el número de centrosomas en la muestra de células tumorales, en el que la presencia de centrosomas supernumerarios en la muestra de células tumorales selecciona al sujeto para el tratamiento con un agente que inhibe una cinesina meiótica. Métodos de determinación de números de centrosomas en células son muy conocidos en la técnica y pueden aplicarse a este método de selección de sujetos. Por ejemplo, los centrosomas pueden teñirse fluorescentemente usando un anticuerpo anti-gamma-tubulina y un anticuerpo secundario fluorescentemente marcado, seguido de obtención de imágenes por inmunofluorescencia para cuantificar el número de centrosomas por célula (descrito adicionalmente en los ejemplos).

Preferentemente, la cinesina meiótica es un miembro de la familia de cinesina-14, más preferentemente HSET. Preferentemente, al menos el 50 % de las células tumorales en la muestra de células tumorales contienen centrosomas supernumerarios. Más preferentemente, al menos el 75 % de las células tumorales en la muestra de células tumorales contienen centrosomas supernumerarios. Incluso más preferentemente, al menos el 90 % de las células tumorales en la muestra de células tumorales contienen centrosomas supernumerarios.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como adicionalmente limitantes. El contenido de todas las referencias, entradas de Genbank, patentes y solicitudes de

patente publicadas citadas en toda la presente solicitud se incorporan expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

Ejemplo 1: Identificación de dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a cinesina meiótica

En este ejemplo, se usó un cribado de iARN para definir ampliamente las vías moleculares requeridas para la agrupación de centrosomas supernumerarios. De 8 líneas celulares de *Drosophila* caracterizadas, las células S2 casi tetraploides fueron las más adecuadas para el cribado debido a que >50 % de las células contienen centrosomas adicionales que son eficientemente agrupados en dos polos durante la mitosis. El esquema para el cribado de genoma completo se ilustra en la Figura 1, que proporciona detalles de los procedimientos para los cribados primarios y secundarios.

Se cribaron 23.172 ARNbc que se dirigen a ~99 % del genoma de *Drosophila* (-14.000 genes) para identificar genes cuya inactivación conduce a husos multipolares (desagrupación de centrosomas) en células S2. Se expusieron células S2 a ARNbc durante 4 días y las cifras mitóticas se enriquecieron mediante tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 durante las últimas 9 horas del tratamiento con iARN. Las células se tiñeron para ADN, microtúbulos (MT) y centrosomas, y se adquirieron imágenes con un objetivo 20X, usando un equipo automatizado de alto rendimiento.

Más específicamente, se sembraron células S2 a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en medio de Schneider sin de suero, en placas de 384 pocillos, que se sembraron previamente con 0,25 μ g de ARNbc (los ARNbc están disponibles en el *Drosophila* RNAi Screening Center, DRSC, <http://flyrnai.org>). Las células se incubaron con ARNbc durante 40 minutos a temperatura ambiente (TA) en medio sin suero, seguido por la adición de medio que contenía suero y se incubaron durante 3,5 días para permitir el agotamiento de proteína. Para bloquear la transición metafase-anafase, se añadió MG132 25 μ M, un inhibidor del proteosoma, al final del tratamiento con iARN (células tratadas con iARN de 3,5 días) y se incubaron durante 9 horas adicionales (total de aproximadamente 4 días de incubación con iARN). Para facilitar la unión de células mitóticas, se resuspendieron células tratadas con iARN, se transfirieron a placas de 384 pocillos nuevas que se recubrieron previamente con concanavalina A (Con-A, 0,25 mg/ml), y las placas se centrifugaron a 1.000 rpm durante 1 minuto. Las células se fijaron en 4 % de paraformaldehído (PFA) en PBS (pH 7,2), se permeabilizaron con PBS-Triton 0,01 % (PBST), se incubaron con 0,5 % de SDS en PBST, y se mantuvieron en PBST a 4 °C hasta que avanzó a inmunotinción.

Para el cribado primario, las células fijadas se tiñeron para MT y centrosomas con anticuerpos FITC-anti-alfa-tubulina (DM1A, 1:300, Sigma) y anti-gamma-tubulina de ratón (GTU88, 1:500), respectivamente. Se usó Alexa Fluor 568 o 594-anti-IgG de ratón de burro como anticuerpos secundarios (1:1000). Las células se tiñeron para ADN con Hoechst 33342 (1:5000, Invitrogen) en PBST y se guardaron en la misma solución a 4 °C.

Para el cribado primario, se obtuvieron imágenes de las células usando un microscopio automatizado, tanto ImageXpress Micro (Molecular Devices, ICCB, microscopio epifluorescente invertido completamente automatizado, auto-foco láser, equipado con la cámara CCD digital Photometrics CoolSNAP ES, MetaXpress para el análisis), o el Discovery-1 (Molecular Devices, DRSC, filtro automático y ruedas dicroicas y torreta de seis objetivos, auto-foco láser de alta velocidad, y puede medir hasta ocho fluoróforos por ensayo en placas multi-pocillos), usando un objetivo de aire de 20X. El auto-foco se realizó en FITC (MT) y se adquirieron imágenes de plano focal individual para tres canales (Hoechst, Cy3, y FITC).

El cribado secundario se realizó en placas de 96 pocillos (1 μ g de ARNbc/pocillo para 5×10^4 células/pocillo) y siguió casi la misma metodología que el cribado primario. Al final de la iARN, las células se transfirieron a placas de fondo de vidrio de 96 pocillos (Whatman) para la obtención de imágenes de alta resolución. Las células se tiñeron adicionalmente para identificar células mitóticas con anti-fosfo-histona H3 de conejo y Alexa Fluor 660-anti-IgG de conejo de burro. Para garantizar la obtención de imágenes de todos los centrosomas, se tomaron imágenes 3D con un microscopio Zeiss Axiovert y software Slidebrook (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO) usando un objetivo ELWD de aire de 40X (Zeiss) con 1 μ m de tamaño de etapa. Se ajustaron manualmente la altura (inicio y punto final) de Z pilas para las 701 condiciones de iARN.

Por inspección visual de ~96.000 imágenes, se puntuó el porcentaje de husos multipolares para cada condición de iARN. Los resultados del cribado se resumen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de resultados del cribado de iARN en células S2

	Número
Total cribado	23.172 ARNbc
No determinado (N.º de huso < 10)	148
Puntuados como aciertos en el cribado primario	701 genes
Aciertos probados del cribado primario	292 genes
Aciertos totales después del cribado secundario	133 (46 %) genes

	Número
Aciertos con homólogos de mamífero	82 (62 %) genes

Usando un intervalo de confianza del 95 %, el cribado primario identificó 701 candidatos asociados a un fenotipo de huso multipolar. Se seleccionaron 292 genes como cohorte inicial para el estudio adicional basado en: la intensidad del fenotipo, la existencia de homólogos de mamífero, fácilmente identificables, y algunos efectos inespecíficos o no predichos. Adicionalmente, se eliminaron la mayoría de los genes que fueron previamente determinados por ser requeridos para citocinesis en células de *Drosophila* (Echard, A. et al. (2004) *Curr Biol* 14:1685-1693; Eggert, U.S. et al. (2004) *PLoS Biol* 2:e379) debido a que la multipolaridad del huso puede ser un efecto secundario del fallo de citocinesis (Goshima, G. et al. (2007) *Science* 316:417-421). De los 292 genes seleccionados para el cribado secundario, se confirmó que 133 tenían una función fiable en el agrupamiento de centrosomas. Entre los genes validados, el 62 % de los genes identificados (83 de los 133 genes) tienen homólogos de mamífero, mientras que el 33 % de los genes (44) no tienen una función conocida. El agrupamiento de centrosomas puede producirse con eficiencia variable. Se distinguieron las siguientes clases de defectos: husos bipolares con múltiples centrosomas difundidos alrededor del huso, husos multi-áster pequeños y husos multipolares grandes.

El cribado identificó genes implicados en una diversa variedad de procesos celulares, sugiriendo la complejidad no apreciada en los mecanismos que controlan la organización de centrosomas supernumerarios, que incluyen varios genes que promueven del agrupamiento de MT del huso, por ejemplo, la cinesina Ncd dirigida al extremo menos (HSET humana). El cribado también identificó genes en procesos inesperados. El descubrimiento de genes requeridos para SAC, actina, polaridad celular y adherencia de células sugirió novedosos mecanismos que suprimen mitosis multipolares. Más adelante se presentan experimentos que definen tres mecanismos de solapamiento que suprimen mitosis multipolares: un mecanismo de cronometraje que emplea SAC, mecanismo de agrupación de polos intrínsecos que se basan en reguladores de MT, y un novedoso mecanismo que requiere actina y adherencia celular.

Ejemplo 2: El punto de regulación del ensamblaje del huso (SAC) previene mitosis multipolares

Se requieren los componentes de SAC Mad2, BubR1 (Bub1 humano) y CENP-Meta (CENP-E humano) para el agrupamiento de centrosomas. La Figura 2 ilustra que Mad2 se requiere para el agrupamiento de centrosomas. Se puntuaron los defectos del agrupamiento de centrosomas en células S2 tras la iARN de EGFP, Mad2 solo y EGFP o Mad2 más 7 horas de tratamiento con MG132. El gráfico de la Figura 2 muestra el promedio de tres experimentos independientes (media \pm DE, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, prueba de la t de Student).

Los resultados mostrados en la figura 2 indican una función para el SAC en el proceso de agrupamiento de centrosomas. Este requisito era incluso más evidente en células que no se trataron con MG132, que indica que el corto tratamiento con MG132 empleado en el cribado enmascaró parcialmente el efecto de la iARN del gen SAC sobre la multipolaridad del huso. Este hallazgo era algo sorprendente, dado el trabajo previo en células Ptk1 que sugería que SAC no era activado por husos multipolares o múltiples centrosomas (Sluder, G. et al. (1997) *J Cell Sci* 110 (Pt 4): 421-429).

La obtención de imágenes de lapso de tiempo soportó una función para SAC en prevenir las mitosis multipolares. En células S2 donde los centriolos y MT se marcaron con GFP-SAS-6 y mCherry- α -tubulina, hubo una clara correlación entre un aumento del número de centrosomas y un tiempo requerido prolongado para formar un huso bipolar (2,7 veces). Se midió el intervalo entre NEBD y la aparición de la anafase (visualizado con GFP-Cid, CENP-A de *Drosophila*) comparando células con 2 o >2 centrosomas. Con respecto a las células con 2 centrosomas, células con múltiples centrosomas presentaron un marcado retraso en la aparición de la anafase (1,8 veces). Además, el retraso en la aparición de la anafase fue suprimido por el iARN de Mad2, y estas células entraron en la anafase con centrosomas desagrupados y cinetocoros erróneamente alineados. Sugiriendo adicionalmente la activación de SAC, los husos de preanafasa multipolares tuvieron un fuerte aumento en el número de focos de BubR1 con respecto a los husos de metafase bipolares. Finalmente, el requisito para que SAC prevenga las mitosis multipolares puede ser parcialmente suprimido por un retraso de metafase artificial impuesto mediante tratamiento con MG132. Esto sugiere que SAC no monitoriza mitosis multipolares por sí, sino que la activación de SAC, probablemente desencadenada por la unión o tensión anormal de cinetocoros, proporciona tiempo suficiente para que los mecanismos compensatorios organicen centrosomas múltiples.

Ejemplo 3: Fuerzas de agrupamiento de polos intrínsecas al huso previenen mitosis multipolares

Un trabajo previo en células S2 ha demostrado una función crítica para motores de MT y MAP en el enfoque de polos del huso (Goshima, G. et al. (2005) *J Cell Biol* 171:229-240; Morales-Mulia, S. y Scholey, J.M. (2005) *Mol Biol Cell* 16:3176-3186). El cribado descrito en el Ejemplo 1 identificó Ncd, un miembro de la familia de cinesina-14, como el acierto más fuerte en el cribado primario. Ncd es un motor dirigido al extremo menos que agrupa MT en los polos del huso (Karabay, A. y Walker, R.A. (1999) *Biochemistry* 38:1838-1849). Por marcado de GFP-SAS-6, se demostró que Ncd se requiere para agrupar múltiples centrosomas. No se identificó dineína de *Drosophila* en el cribado. Esto es esperado debido a que en células S2 la pérdida de dineína no induce significativamente mitosis multipolares, aunque compromete la unión de centrosomas y el estrecho enfoque de los polos del huso (Goshima,

G. et al. (2005) J Cell Biol 171:229-240). Validación adicional del cribado confirmó la función de la Asp de MAP en el enfoque de polos (Morales-Mulia, S. y Scholey, J.M. (2005) Mol Biol Cell 16:3176-3186; Wakefield, J.G. et al. (2001) J Cell Biol 153:637-648).

5 Adicionalmente, el cribado identificó varios otros factores que contribuyen a la cohesión intrínseca de los MT del huso. Se identificó un requisito para Bji/RCC1 (RanGEF) en el agrupamiento de centrosomas, de acuerdo con su función en prevenir la mitosis multipolar en células de mamífero (Chen, T. et al. (2007) Nat Cell Biol 9:596-603). También se identificaron funciones para los factores de ribosilación de ADP tanquirasa y CG15925, un supuesto homólogo de PARP-16 humano (Schreiber, V. et al. (2006) Nat Rev Mol Cell Biol 7:517-528). Se cree que la
10 ribosilación de ADP por tanquirasa contribuye a la bipolaridad del huso proporcionando una matriz estática que puede anclar motores de MT y otras proteínas del huso (Chang, P. et al. (2005) Nat Cell Biol 7:1133-1139). Previamente no se ha descrito una función para PARP-16 en la mitosis.

Ejemplo 4: La fuerzas dependientes de actina regulan la multipolaridad del huso

15 Además de genes que probablemente contribuyen al agrupamiento y organización de MT del huso, inesperadamente, también se identificaron genes implicados en la organización y regulación del citoesqueleto de actina, tal como la formina Form3/ INF2 (Chhabra, E.S. y Higgs, H.N. (2006) J Biol Chem 281:26754-26767). La inactivación de estos genes no induce mitosis multipolares indirectamente, desencadenando el fallo de citocinesis.
20 Experimentos que usan un breve tratamiento (2 h) con moléculas pequeñas que alteran el citoesqueleto de actina similarmente inducen mitosis multipolares.

Más específicamente, se trataron células con latrunculina (LatA 40 μ M), citocalasina D (20 μ M) durante 2 horas y se determinó el porcentaje de defectos del agrupamiento de centrosomas. Los resultados se muestran en la Figura 3,
25 que demuestra el requisito para el citoesqueleto de actina para el agrupamiento de centrosomas en células S2. El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes (media \pm DE, * p <0,05; ** p <0,005, prueba de la t de Student).

Además, la obtención de imágenes de células vivas de células S2 reveló que la actina es de hecho requerida para el
30 agrupamiento inicial de múltiples centrosomas. Con respecto a los controles (14,7 \pm 6,4 min), hubo un retraso de 1,5 veces en el agrupamiento de centrosomas en 13/15 células tratadas con LatA (22,1 \pm 12,3 min). Las 2/15 células restante dejaron completamente de agrupar centrosomas adicionales. Es probable el retraso del ciclo celular inducido por el tratamiento con LatA debido a la activación de SAC, como se evidencia por el prominente marcado de cinetocoros con BubR1 en células tratadas con LatA.

35 A continuación, se determinó si la contracción cortical se requiere para el agrupamiento de centrosomas. Se expusieron células, durante 2 horas, a concanavalina A (Con-A) de lectina tetravalente soluble, que reticula la membrana plasmática y así bloquea globalmente la contracción cortical (Canman, J.C. y Bement, W.M. (1997) J Cell Sci 110 (Pt 16):1907-1917). Se determinó el porcentaje de defectos del agrupamiento de centrosomas después del
40 tratamiento con Con-A. Los resultados también se muestran en la Figura 3, que demuestra que el tratamiento con Con-A indujo los defectos de agrupamiento de centrosomas.

Además, se encontró que el potenciar la contractilidad basada en miosina puede suprimir la multipolaridad del huso. Bajas concentraciones de camenteculina A (CA) inhiben la fosfatasa de cadena ligera de miosina (MLCP) y promueven la activación de miosina II sin alterar su distribución (Gupton, S.M. y Waterman-Storer, C.M. (2006) Cell
45 125:1361-1374). Células S2 no mutantes tratadas con CA tuvieron una modesta disminución en el agrupamiento de defectos de centrosomas (15 % al 9 %). Además, el tratamiento con CA rescató parcialmente el defecto de agrupamiento de centrosomas inducido por iARN de Ncd. Así, en células con centrosomas adicionales, la actina y la contractilidad basada en actina influyen en si la mitosis es bipolar o multipolar.

50 También se determinó si la actina y las fuerzas del huso intrínsecas actúan o no cooperativamente para prevenir mitosis multipolares. De hecho, el tratamiento con LatA en células agotadas en Ncd o Bji/RCC1 produjo un aumento combinatorio en la multipolaridad del huso. Para evaluar adicionalmente esta idea, se usó microscopía de disco giratorio de lapso de tiempo para definir la trayectoria del movimiento de centrosomas en células S2 agotadas en
55 Ncd. A diferencia de las células de control, los centrosomas en células agotadas en Ncd presentaron un notable aumento en la movilidad; aumentó tanto la velocidad como el grado de movimiento. Además, el volumen del movimiento de centrosomas se dirigió lejos del huso y hacia la corteza celular. La movilidad de centrosomas en células agotadas en Ncd se redujo seriamente por exposición transitoria de células a LatA, demostrando un requisito de la actina para estas fuerzas de empuje cortical. Así, las fuerzas corticales colaboran con las fuerzas de
60 agrupamiento del huso intrínsecas para organizar múltiples centrosomas.

Estos resultados también proporcionaron percepción en la naturaleza de los generadores de fuerza cortical que regulan la multipolaridad del huso. Se encontró que CLIP-90 de +TIP de MT y la miosina Mio10A son importantes para el agrupamiento de centrosomas. Mio10A de *Drosophila* es un homólogo de Mio15 humana que puede unirse a
65 MT mediante un único dominio MyTH4-FERM. Mio10, un miembro de la miosina que contiene MyTH4-FERM de mamífero, es conocido por ser requerido para el posicionamiento del huso (Sousa, A.D. y Cheney, R.E. (2005)

Trends Cell Biol 15:533-539; Toyoshima, F. y Nishida, E. (2007) EMBO J 26:1487-1498; Weber, K.L. et al. (2004) Nature 431:325-329). La iARN de Mio10A, pero no la otra Mio7 que contiene MyTH4-FERM de *Drosophila*, indujo un aumento de 2 veces en los defectos de agrupamiento de centrosomas sin fallo de citocinesis (Eggert, U.S. et al. (2004) PLoS Biol 2, e379). Además, la inactivación de Mio10A no tuvo un efecto aditivo sobre la multipolaridad del huso si las células se trataron concomitantemente con LatA. Finalmente, el seguimiento de centrosomas de células agotadas en Mio10A reveló un efecto similar sobre el movimiento de centrosoma que el tratamiento con LatA; en células agotadas de Mio10, solo se detectaron movimientos aleatorios o enormemente reducidos de centrosomas a diferencia del amplio movimiento corticalmente dirigido mostrado en células agotadas en Ncd. Juntos, los datos demuestran que múltiples centrosomas están organizados combinatoriamente por fuerzas intrínsecas al huso y por fuerzas corticales dependientes de actina que actúan al menos en parte sobre MT astrales.

Ejemplo 5: Efectos de la forma de la célula, polaridad de la célula y de la adherencia sobre la multipolaridad del huso

El cribado identificó un requisito de genes implicados en la adherencia celular para el agrupamiento de centrosomas: Turtle, Echinoide, Cad96Ca, CG33171 y Fit1. Parece que el dominio FERM de *Drosophila* que contiene la proteína Fit1 tiene una función altamente conservada en regular la adherencia a la matriz celular en eucariotas superiores (Rogalski, T.M. et al. (2000) J Cell Biol 150:253-264; Tu, Y. et al. (2003) Cell 113:37-47). El homólogo Fit1 de mamífero, Mig-2/PLEKHC1 humano, se localiza en adhesiones focales (FA) y es importante para la adherencia celular mediada por integrina y la modulación de la forma de la célula uniendo integrinas al citoesqueleto de actina (Tu, Y. et al. (2003) Cell 113:37-47). La proteína CG33171 no caracterizada tiene homología con Col18A de mamífero, previamente implicado en la regulación de la adherencia de la matriz celular (Dixelius, J. et al. (2002) CANCEL Res 62:1944-1947; Wickstrom, S.A. et al., (2004) J Biol Chem 279:20178-20185). Los dominios de tipo III de fibronectina que contienen Turtle y Echinoide participan en la adherencia célula-célula (Bodily, K.D. et al. (2001) J Neurosci 21:3113-3125; Wei, S.Y. et al. (2005) Dev Cell 8:493-504). Además, fueron identificados el gen de polaridad posterior/lateral PAR-1 (miembro de la familia PAR-1/MARK/KIN1) y los genes de polaridad apical Crumbs y Cornetto, que son importantes para la función astral de MT, división celular asimétrica y polaridad epitelial (Bulgheresi, S. et al. (2001) J Cell Sci 114:3655-3662; Munro, E.M. (2006) Curr Opin Cell Biol 18:86-94; Tepass, U. et al. (2001) Annu Rev Genet 35:747-784). Varios de estos genes han sido previamente identificados debido a su requisito para mantener la forma celular de la interfase normal y la adherencia. De hecho, el tratamiento con LatA o el agotamiento de Mio10 no mostraron potenciamiento de la multipolaridad del huso cuando se combinaron con el agotamiento de proteínas CG33171, Fit1, Crumbs, Cornetto, o PAR-1, que demuestra que estos genes influyen en el agrupamiento de centrosomas mediante el citoesqueleto de actina.

Ejemplo 6: Conservación de los mecanismos para prevenir mitosis multipolares

Se determinó a continuación si las células cancerosas de mamífero utilizaban mecanismos similares para agrupar múltiples centrosomas como se observa en células S2. Esto se hizo para establecer la relevancia del cribado para cáncer humano y debido a técnicas que utilizan células cancerosas de mamífero que permitieron la caracterización directa de los efectos de la adherencia y de la forma de la célula sobre mitosis multipolares. Aunque hay alguna variabilidad en su eficiencia, la agrupación de centrosomas adicionales se observa comúnmente en células de mamífero.

Para determinar el efecto de la alteración transitoria de actina en células de mamífero, se trataron las líneas celulares MCF-7, MDA-231, MMEDX 4N y N1E-115 con DMSO, LatA (5 μ M) o dihidrocitocalasina B (DCB) (10 μ M) durante 2 horas. La línea celular MCF-7 contiene 2 centrosomas mientras que las otras líneas celulares contienen más de 2 centrosomas. Los resultados se muestran en la Figura 4. El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes (media \pm DE, * p <0,05; ** p <0,005; *** p <0,001, prueba de la t de Student). Como se ilustra en la Figura 4, la alteración transitoria de actina condujo a un aumento significativo en la frecuencia de husos multipolares en líneas celulares que contenían centrosomas múltiples, pero no en células con el número normal de centrosomas. Estos husos multipolares produjeron la desagrupación de centrosomas adicionales y no fue debido a la separación/fragmentación de centriolos. La actina influye supuestamente en el posicionamiento de centrosomas mediante fuerzas en los MT astrales. De acuerdo con esta idea, el tratamiento con nocodazol de baja dosis, que desensambla selectivamente MT astrales (Thery, M. et al. (2005) Nat Cell Biol 7:947-953), aumentó la frecuencia de husos multipolares específicamente en células con centrosomas adicionales.

El paralelismo entre células de *Drosophila* y de mamífero se extendió a los requisitos genéticos para el agrupamiento de centrosomas. Para examinar esto adicionalmente, se realizaron experimentos de ARNip con HSET de mamífero (homólogo de Ncd) y genes Mio10, del siguiente modo. Se compraron conjuntos mixtos (los conjuntos ON-TARGETplus y SMART) de 4 oligonucleótidos diferentes de ARNip contra HSET humana, Mio10 humana y Mio10 de ratón de Dharmacon. El ARNip contra HSET de ratón se compró de Ambion. No se usó ARNip desordenado específico como control (Ambion). La secuencia de oligonucleótidos de los ARNip se expone a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos de ARNip

	Secuencia de oligonucleótidos 5' - 3'	ARNip ID N.º	SEQ N.º
HSET humana	UAACUGACCCUUUAAGUCCUU	J-004958-06	1
	AGUGUUGUGCGCUCUGUCCUU	J-004958-07	2
	GACACAAGCACGCAAGUUCUU	J-004958-08	3
	UGGUCCAACGUUUGAGUCCUU	J-004958-09	4
Mio10 humana	CAAGUUGAGAUUUUAUGUCCUU	J-007217-05	5
	UAAGACAUCAGCUACGACGUU	J-007217-06	6
	UAAUCUACAAUUCUCCCGCUU	J-007217-07	7
	AUUCUCCUGAAAUUUCUCCUU	J-007217-08	8
HSET de ratón	GGCUAAUAAGAAGUGAAGtt	287750	9
	GGAACUGAAGGGCAAUAUCtt	287751	10
	GGCAUUAACAGCAGUCUGtt	287752	11
Mio10 de ratón	UUCACGGUGCCCUUGAGCUU	J-062004-09	12
	UUCUCCUCGCUAUCGUUUUUU	J-062004-10	13
	UUUCUUGUGCAGCCAGCCUUU	J-062004-11	14
	UACAUCAGCUUCGACUGGCUU	J-062004-12	15

Se transfectaron células con Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) con una concentración de ARNip final de 50 nM según las instrucciones del fabricante. Las células se analizaron/recogieron tres días después de la transfección (a menos que se especifique lo contrario). Las Figuras 5 y 6 muestran los resultados de transferencias Western que muestran el agotamiento de HSET (Figura 5) o Mio10 (Figura 6) después de tres días de ARNip en células MDA-231 y MCF-7. La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células con husos multipolares en células MCF-7 o MDA-231 tras el tratamiento con ARNip de HSET o Mio10. Los resultados mostrados en la Figura 7 demuestran que ARNip del homólogo de Ncd HSET (un miembro de cinesina-14) y Mio10 aumentó la frecuencia de multipolaridad, específicamente en células que alojan múltiples centrosomas (es decir, células MDA-231). Como en las células S2, la multipolaridad inducida por Mio10 no es una consecuencia del fallo de la citocinesis.

Finalmente, se determinó si el citoesqueleto de actina cortical influye en la organización del centrosoma en paralelismo con las fuerzas de agrupamiento de polos del huso intrínsecas, mediante tratamiento con ARNip de HSET o Mio10 en combinación con el agente de alteración de actina LatA. Como se muestra en la Figura 8, la alteración de tanto actina como HSET tuvo un efecto combinatorio, aumentando la frecuencia de husos multipolares con respecto a los tratamientos individuales. Cuando se combina ARNip de Mio10 con tratamiento con LatA no se observó tal efecto. Así, mecanismos de solapamiento similares previenen las mitosis multipolares en células cancerosas de mamífero y células S2 de *Drosophila*.

Ejemplo 7: Forma de la célula en la interfase, adherencia y mitosis multipolares

Aunque las células se redondean en la mitosis, preservan una memoria de su forma en la interfase reteniendo fibras de retracción que contienen actina (RF) unidas a sitios de fuerte adherencia de la matriz celular (Mitchison, T.J. (1992) Cell Motil Cytoskeleton 22:135-151; They, M. and Bornens, M. (2006) Curr Opin Cell Biol 18:648-657). Se sabe que el patrón de adherencia de la interfase y la distribución de RF que contienen actina influyen fuertemente en la orientación del huso durante la mitosis (They, M. et al. (2007) Nature 447:493-496; They, M. et al. (2005) Nat Cell Biol 7:947-953). El hallazgo del cribado que prevenir las mitosis multipolares requiere tanto genes de adherencia de la matriz celular como reguladores de actina, sugirió una interesante hipótesis: estos productos génicos podrían actuar cooperativamente para organizar centrosomas adicionales afectando la distribución y/o la composición de las fibras de retracción (RF) y así los generadores de fuerza cortical.

Varias líneas de evidencia soportan esta hipótesis. Primera, se usó obtención de imágenes de células vivas para correlacionar la forma de la célula en la interfase con el patrón de división celular durante la mitosis. MDA-231 (células de cáncer de mama que contienen centrosomas adicionales) que adoptaron una forma alargada o polarizada en la interfase, casi experimentaron uniformemente divisiones bipolares. Por el contrario, células MDA-231 que adoptaron una forma redonda en la interfase tuvieron un aumento de frecuencia de divisiones multipolares. Segundo, en células BSC-1 tetraploides, cuyas RF gruesas son fácilmente visualizadas por obtención de imágenes de DIC, se observó una fuerte correlación entre el posicionamiento de las RF y si las células experimentaron o no una división bipolar (distribución bipolar de RF) o multipolar (distribución isotrófica de RF). Tercero, las RF acumulan proteínas específicas, tales como la proteína de ERM ezrina, que participan en la heterogeneidad cortical y así la generación de fuerza local sobre los MT astrales. La alteración de esta heterogeneidad cortical por el inhibidor de src cinasas PP2 (They, M. et al. (2005) Nat Cell Biol 7:947-953), también indujo husos multipolares en MDA-231, pero no en células MCF-7. Cuarto, para evaluar la función de la adherencia de la matriz celular para la eficiencia de la mitosis, se sembraron células a diferentes concentraciones de fibronectina (FN) para variar la intensidad de la unión de la matriz celular. Concentraciones de FN que inhiben la renovación de adherencia focal (FA) (30 µg/ml) aumentaron la frecuencia de husos multipolares en células MDA-231, pero no en células MCF-7. Además, este efecto podrían ser invertido por CA, que promueve la renovación de FA, aumentando la contractilidad cortical (Gupton, S.L. y Waterman-Storer, C.M. (2006) Cell 125:1361-1374).

Para probar directamente la función del patrón de adherencia celular y el posicionamiento de RF en el agrupamiento de centrosomas, se usó impresión de micro-contactos de FN para manipular los patrones de adherencia celular (Thery, M. et al. (2005) Nat Cell Biol 7:947-953). Células MDA-231 sembradas en micropatrones con forma de Y o con forma de O tuvieron un aumento significativo (3-4 veces) de husos multipolares en comparación con los controles. A diferencia, el sembrar células sobre micropatrones en forma de H suprimió la frecuencia de husos multipolares con respecto a células de control (2 %, la mitad del control). Así, las disposiciones O y Y de contactos adhesivos sesga las células en mitosis multipolares, mientras que las disposiciones bipolares de contactos adhesivos (forma H) promueven las mitosis bipolares. Estos hallazgos demuestran que el patrón de adherencia de células en la interfase, y así la forma de la célula, puede tener una influencia sorprendente sobre la fidelidad de la mitosis - específicamente en célula cancerosa que contiene centrosomas adicionales.

Ejemplo 8: La alteración del agrupamiento de centrosomas puede destruir selectivamente células cancerosas

En principio, la alteración del agrupamiento de centrosomas podría tener un efecto selectivo sobre la viabilidad de células cancerosas que contienen múltiples centrosomas debido a que la mayoría de las células somáticas tienen dos centrosomas durante la mitosis. Como una primera etapa hacia la evaluación de esta posible estrategia terapéutica, se determinó la sensibilidad de diferentes líneas de células cancerosas para inactivar HSET.

HSET es una diana terapéutica particularmente interesante debido a que no es esencial para la división celular en células normales y las cinesinas son susceptibles a la inhibición de moléculas pequeñas (Mayer, T.U. et al. (1999) Science 286:971-974; Mountain, V. et al. (1999) J Cell Biol 147:351-366). El agotamiento de HSET por ARNip conduce a un aumento en los husos multipolares en células cancerosas humanas que contienen múltiples centrosomas (véase la Figura 7, descrita adicionalmente en el Ejemplo 6 anterior). Para determinar las consecuencias del desagrupamiento de centrosomas, se monitorizó la división celular en múltiples líneas celulares que contenían centrosomas adicionales usando microscopía de DIC. El agotamiento de HSET humana, confirmado con 3 ARNip independientes, indujo un espectacular aumento en las anafases multipolares (88 %) en células N1E-115 en las que casi el 100 % de las células contienen centrosomas adicionales (Spiegelman, B.M. et al. (1979) Cell 16:253-263). Se obtuvo un resultado similar con células MDA-231 donde ~50 % de las células contenían centrosomas adicionales (24 % después del agotamiento de HSET) y con células BJ y NIH-3T3 tetraploides con centrosomas adicionales. Por el contrario, la inactivación de HSET no tuvo efecto sobre la división celular en una variedad de células de control diploides.

La Figura 9 ilustra la pérdida de viabilidad celular e inhibición de la formación de colonias por células N1E-115 después de 6 días de ARNip de HSET. La Figura 9 muestra el número relativo de células en control y células agotadas en HSET (-HSET) de tres experimentos independientes después de seis días después de la transfección (panel izquierdo) y el número de colonias promedio de dos experimentos independientes en 4 áreas diferentes (panel derecho; área = 10 mm²). Sorprendentemente, el agotamiento de HSET de células N1E-115 durante 6 días, por tratamiento con ARNip, redujo la viabilidad celular más del 90 %, y se mostró que muchas de las células supervivientes eran senescentes.

La Figura 10 ilustra la muerte celular inducida por iARN de HSET en diversas líneas de células cancerosas en proporción a la fracción de células con centrosomas adicionales. El gráfico de barras muestra el número de células relativas en células de control y agotadas en HSET (-HSET) después de seis días después de la transfección con ARNip. El porcentaje de células con más de 2 centrosomas se indica debajo en el gráfico. El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes. Todas las gráficas representan media ± DE (**p<0,005, ***p<0,001, prueba de la t de Student). Así, el agotamiento de HSET indujo muerte celular en diversas líneas de células cancerosas en proporción aproximada a la fracción de células que contenían centrosomas adicionales. A diferencia, la viabilidad de células que poseen principalmente dos centrosomas era solo ligeramente reducida en ausencia de HSET. Así, el desagrupamiento de centrosomas puede inducir muerte celular selectivamente en células con centrosomas supernumerarios.

Resumen del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 - UAACUGACCCUUAAGUCCUU
 SEQ ID NO: 2 - AGUGUUGUGCGCUCUGUCCUU
 SEQ ID NO: 3 - GACACAAGCACGCAAGUUCUU
 SEQ ID NO: 4 - UGGUCCAACGUUUGAGUCCUU
 SEQ ID NO: 5 - CAAGUUGAGAUUUUAGUCCUU
 SEQ ID NO: 6 - UAAGACAUCAGCUACGACGUU
 SEQ ID NO: 7 - UAAUCUACAAUUCUCCGCUU
 SEQ ID NO: 8 - AUUCCUGAAAUUCCUCCUU
 SEQ ID NO: 9 - GGCUAUAAGAAGUGAAGtt
 SEQ ID NO: 10 - GGAACUGAAGGGCAAUAUctt
 SEQ ID NO: 11 - GGCCAUUAACAGCAGUCUGtt
 SEQ ID NO: 12 - UUCCACGGUGCCCUUGAGCUU
 SEQ ID NO: 13 - UUCUCCUCGCUAUCGUUUUUU

ES 2 633 930 T3

SEQ ID NO: 14 - UUUCUUGUGCAGCCAGCCUUU
SEQ ID NO: 15 - UACAUCAGCUUCGACUGGCUU

Listado de secuencias

5
<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC.
<120> MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD ASOCIADA A CINESINA MEIÓTICA

10
<130> P51060EP-K
<140> EP09767337.0
<141> 28-05-2009

15
<150> PCT/US2009/045406
<151> 28-05-2009

<150> US61/057590
<151> 30-05-2008

20
<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

25
<210> 1
<211> 21
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-HSET humana: J-004958-06

35
<400> 1
uaacugaccc uuuaaguccu 21

<210> 2
<211> 21
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-HSET humana: J-004958-07

45

<400> 2
aguguugugc gcucuguccu u 21

50
<210> 3
<211> 21
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

55

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-HSET humana: J-004958-08

60
<400> 3
gacacaagca cgcaaguucu u 21

ES 2 633 930 T3

5
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-HSET humana: J-004958-09

10
 <400> 4
 ugguccaacg uuugaguccu u 21

15
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 humana: J-007217-05

25
 <400> 5
 caaguugaga uuuauguccu u 21

30
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 humana: J-007217-06

40
 <400> 6
 uaagacauca gcuacgacgu u 21

45
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 humana: J-007217-07

55
 <400> 7
 uaaucuacaa uucuccgcu u 21

60
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 humana: J-007217-08

<400> 8
 auuccugaa auuuccuccu u 21

ES 2 633 930 T3

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-HSET de ratón: 287750
 10
 <400> 9
 ggcuaauaag aagugaagtt 20
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-HSET de ratón: 287751
 20
 <400> 10
 ggaacugaag ggcaauauct t 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-HSET de ratón: 287752
 30
 <400> 11
 ggccauaac agcagucugt t 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 de ratón: J-062004-09
 40
 <400> 12
 uuccacggug ccuugagcu u 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 de ratón: J-062004-10
 50
 <400> 13
 uucuccucgc uaucguuuuu u 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 de ratón: J-062004-10
 60
 <400> 13
 uucuccucgc uaucguuuuu u 21
 65

ES 2 633 930 T3

5 <210> 14
<211> 21
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 de ratón: J-062004-11

10 <400> 14
uuucuugugc agccagccuu u 21

15 <210> 15
<211> 21
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> Secuencia de oligonucleótidos de ARNip-Myo10 de ratón: J-062004-12

25 <400> 15
uacaucagcu ucgacuggcu u 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente de iARN que inhibe una cinesina meiótica HSET, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la cinesina meiótica, en el que la enfermedad o trastorno asociado a la cinesina meiótica es una enfermedad o un trastorno proliferativo celular.
2. El agente de iARN para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad o trastorno proliferativo celular es cáncer.
- 10 3. El agente de iARN para su uso según la reivindicación 1, en el que el agente es para administración por vía oral o por vía parenteral.
- 15 4. Un agente de iARN que inhibe una cinesina meiótica HSET para su uso en inhibir el crecimiento de una célula tumoral en el que la proliferación celular está asociada a la cinesina meiótica HSET, poniendo en contacto la célula tumoral con el agente de iARN.
5. El agente de iARN para su uso según la reivindicación 4, en el que dicho poner en contacto comprende inyección directa del agente de iARN en el tumor.
- 20 6. Un agente de iARN que inhibe una cinesina meiótica HSET para su uso en inhibir la proliferación de una célula en la que la proliferación celular está asociada a la cinesina meiótica HSET, poniendo en contacto la célula con el agente de iARN.
- 25 7. El agente de iARN para su uso según la reivindicación 4 o 6, en el que la célula contiene centrosomas supernumerarios.
8. Un método de identificación de un compuesto que inhibe la actividad de una cinesina meiótica HSET, comprendiendo el método
- 30 proporcionar una composición indicadora que comprende la cinesina meiótica HSET;
poner en contacto la composición indicadora con un compuesto de prueba; y
determinar la actividad de la cinesina meiótica HSET en presencia del compuesto de prueba, en el que la actividad de la cinesina meiótica HSET se determina midiendo a) la actividad de unión de microtúbulos de la cinesina; o b) la expresión de ARNm de HSET o proteína, en el que la reducción de actividad de la cinesina meiótica HSET en presencia del compuesto de prueba, en comparación con la actividad de la cinesina meiótica HSET en ausencia del compuesto de prueba, identifica el compuesto de prueba como un compuesto que inhibe la actividad de una cinesina meiótica HSET.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que la composición indicadora se pone en contacto con cada miembro de una biblioteca de compuestos de prueba y se seleccionan uno o más compuestos de prueba dentro de la biblioteca que inhiben la actividad de la cinesina meiótica HSET.
- 40

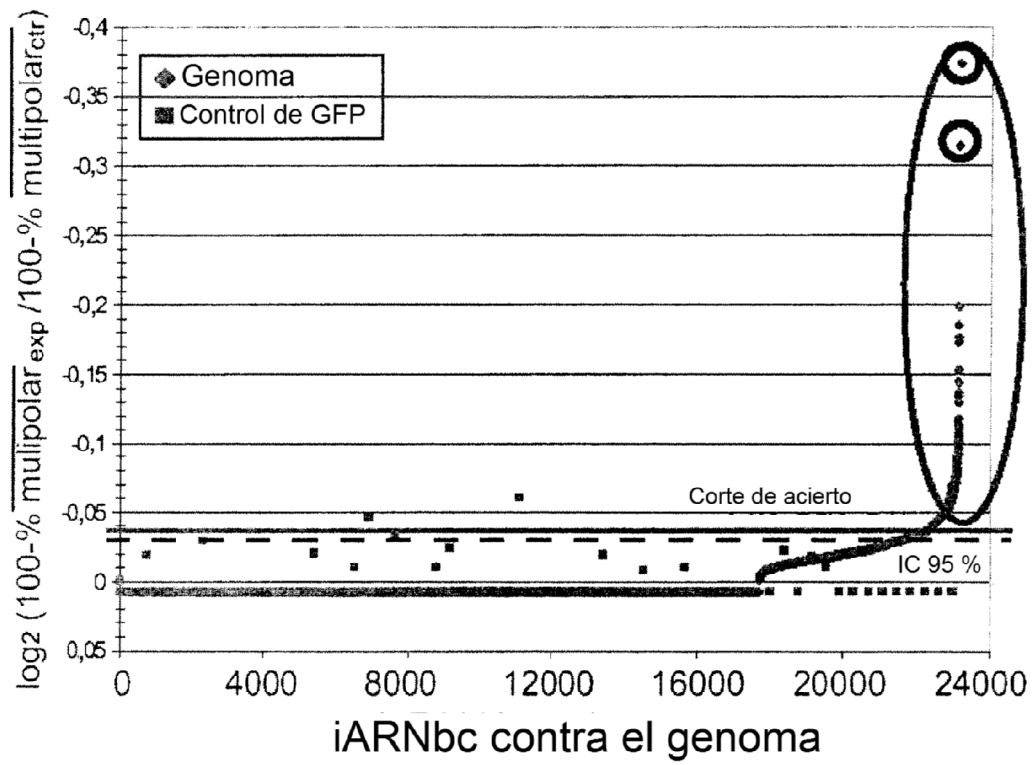


Fig. 1

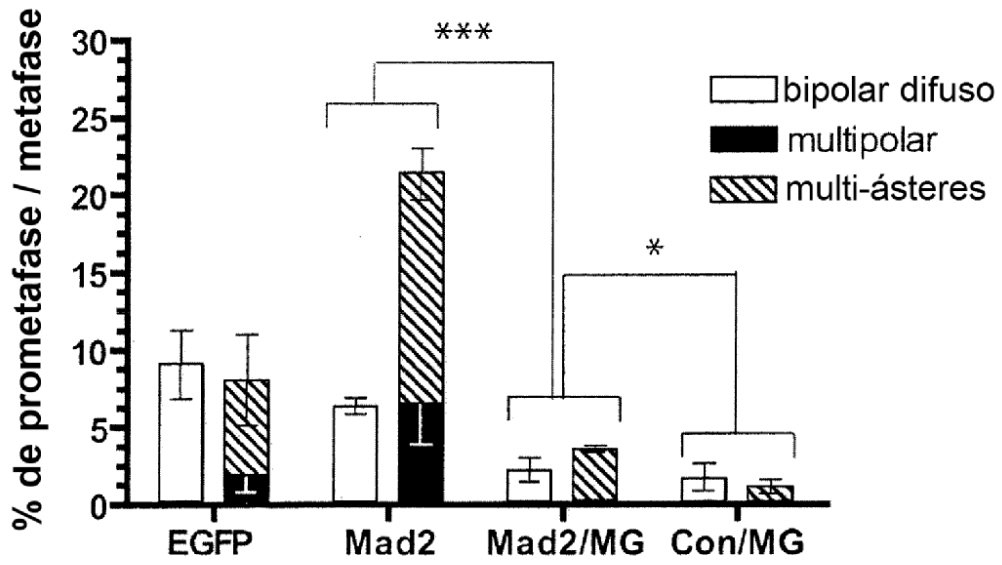


Fig. 2

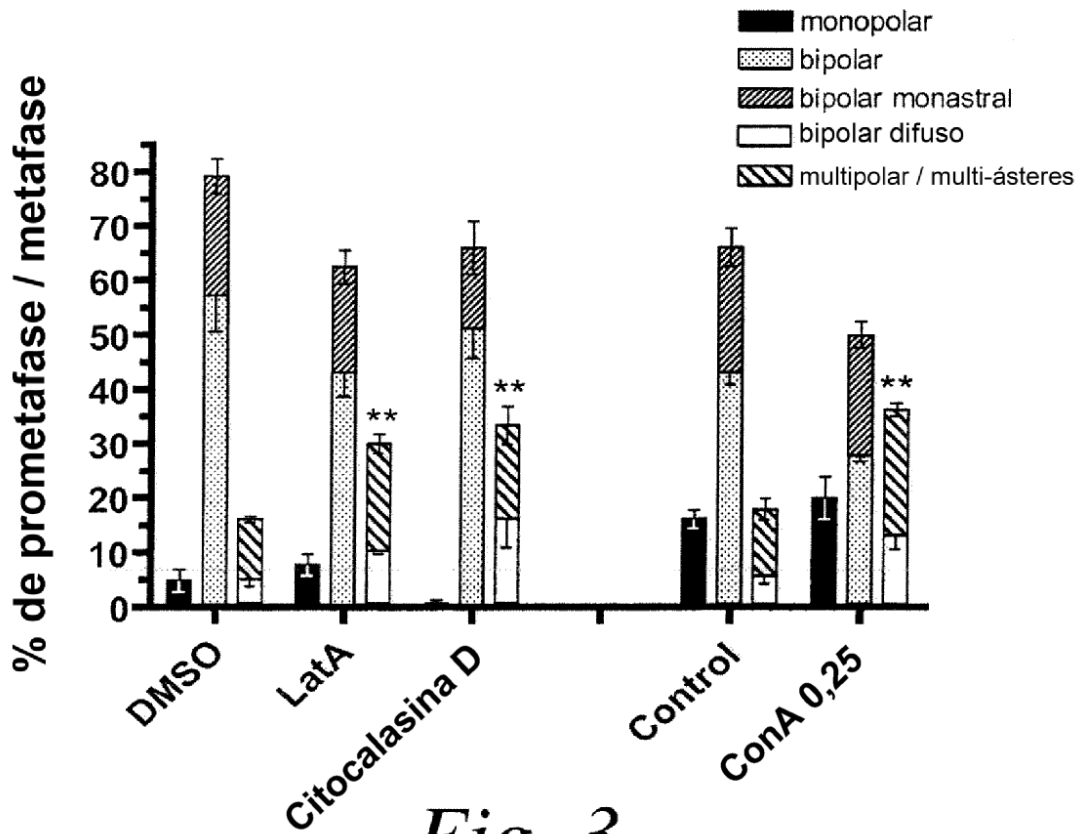


Fig. 3

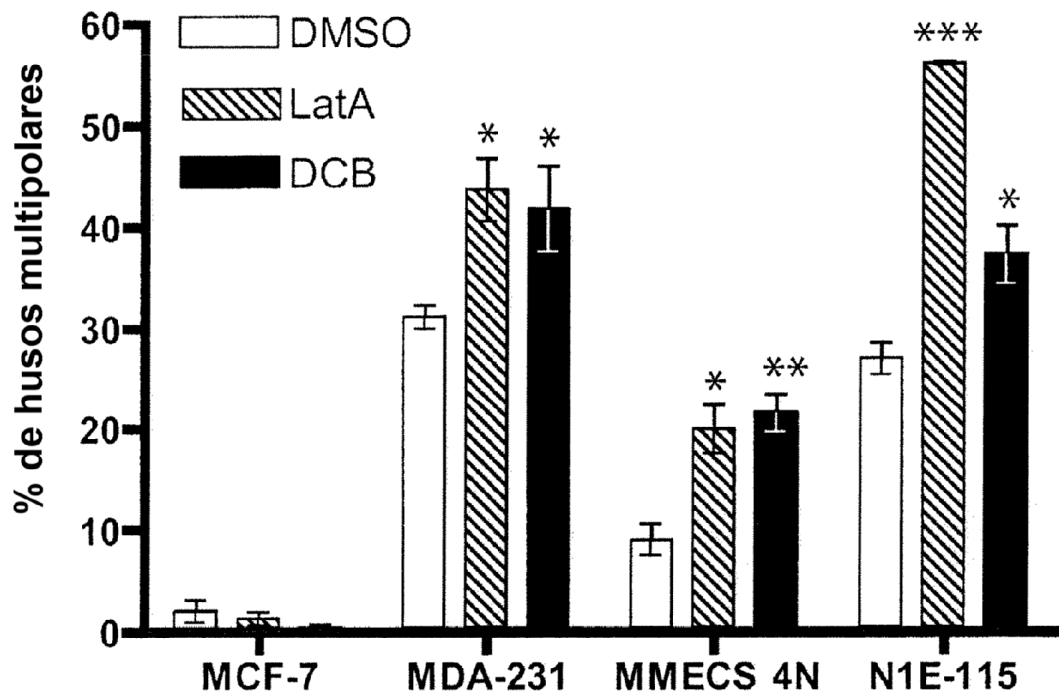


Fig. 4

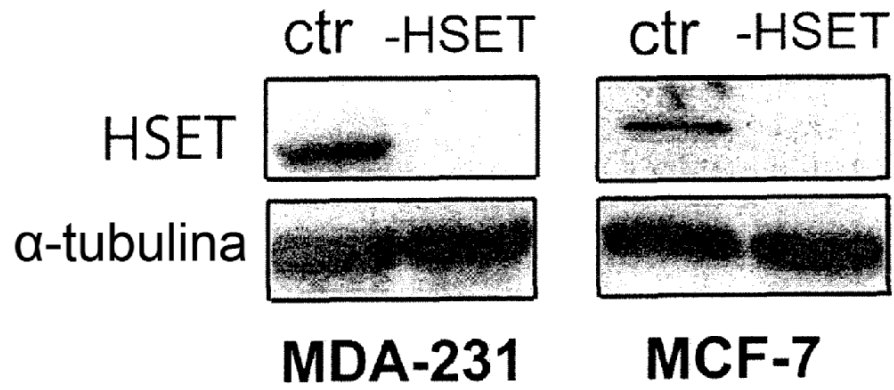


Fig. 5

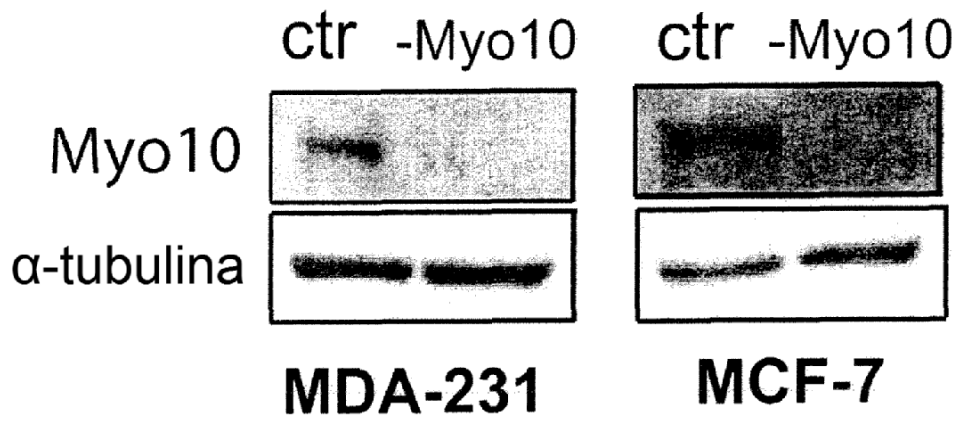


Fig. 6

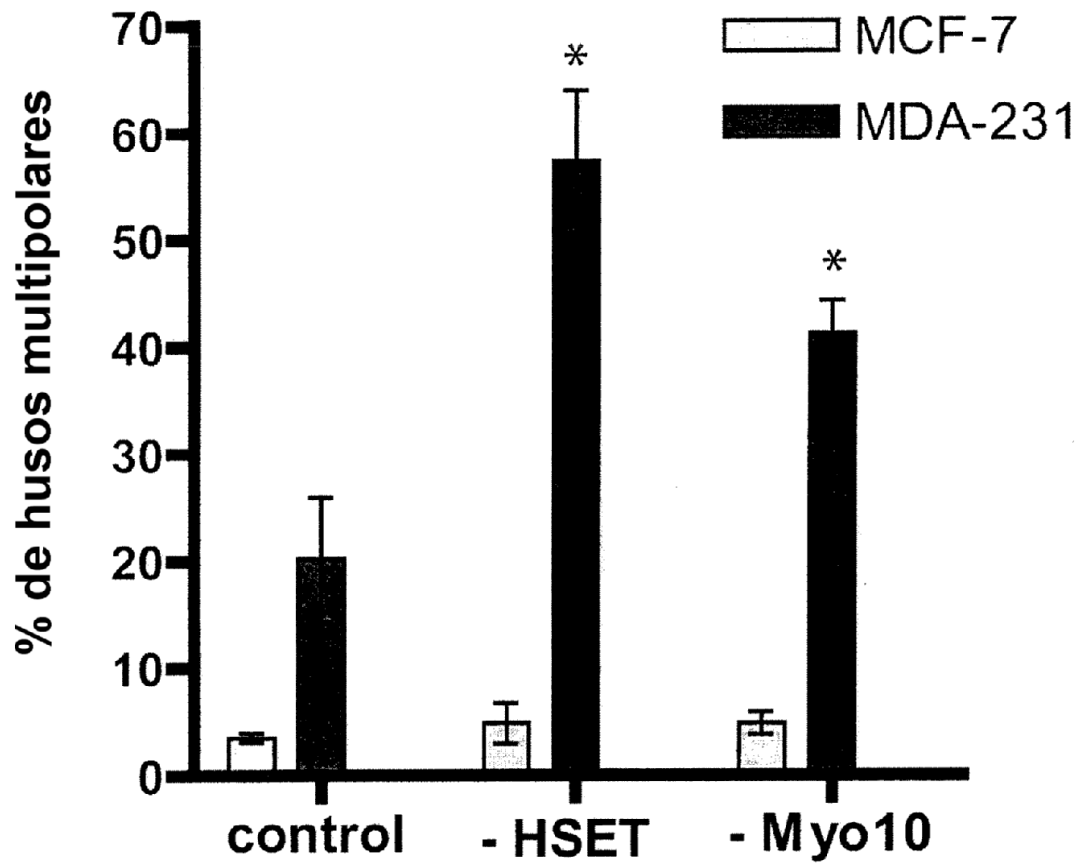


Fig. 7

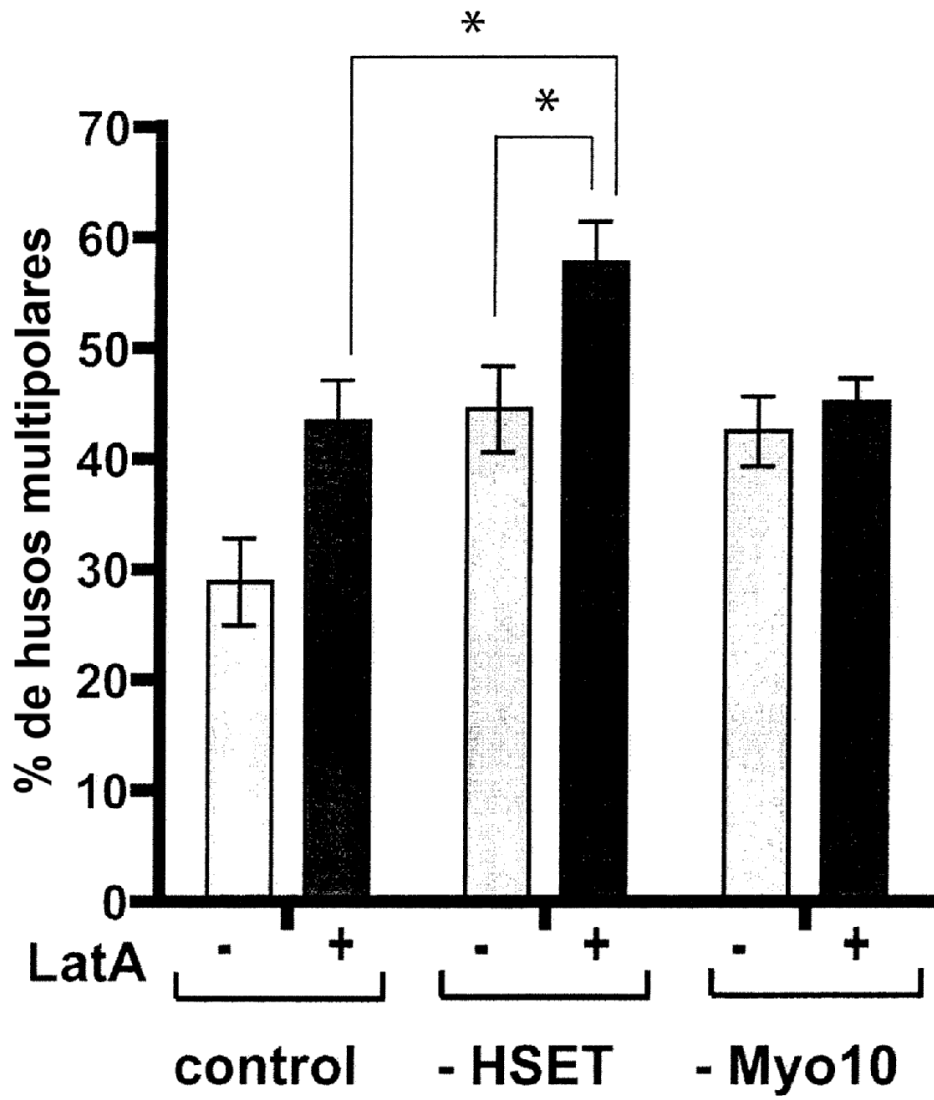


Fig. 8

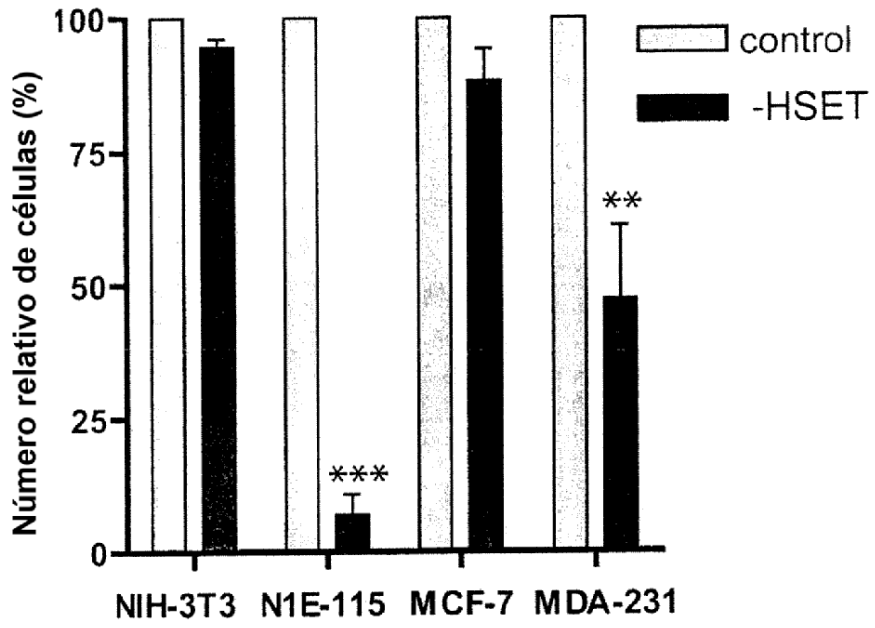


Fig. 9

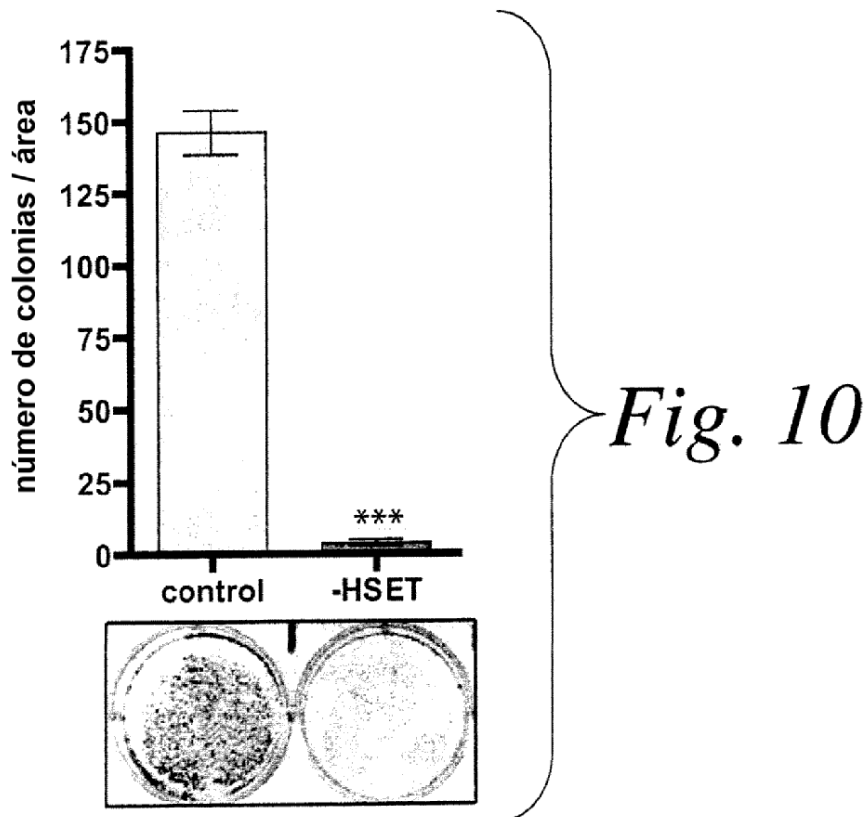


Fig. 10