

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 759**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61K 31/711** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/IB2014/000723**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140797**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14762791 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2968604**

54 Título: **Enfoque basado en microARN para el tratamiento del mesotelioma pleural maligno**

30 Prioridad:

**13.03.2013 US 201313801010**

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

**23.04.2018**

73 Titular/es:

**ASBESTOS DISEASES RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)**

**Gate 3 Hospital Road  
Concord NSW 2139, AU**

72 Inventor/es:

**REID, GLEN y  
VAN ZANDWIJK, NICO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 664 759 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**

Enfoque basado en microARN para el tratamiento del mesotelioma pleural maligno

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo la 35 U.S.C. § 120 de la solicitud provisional de los EE.UU. núm. de serie 13/801,010, presentada el 13 de marzo de 2013.

10 Antecedentes de la invención

Campo técnico

15 La invención se refiere, generalmente, al campo de la biología molecular y el cáncer. Más específicamente, la invención se refiere a los miméticos de microARN que corresponden a la familia miR-15/107 y a los métodos relacionados para usar los miméticos de microARN para tratar el mesotelioma pleural maligno (MPM) mediante el restablecimiento de la regulación de la expresión de los genes diana de la familia miR-15/107 en las células tumorales del MPM.

20 Antecedentes

El mesotelioma pleural maligno es un cáncer casi invariablemente fatal para el que pocos tratamientos están disponibles. Se necesitan con urgencia nuevas terapias, y la expresión alterada de los microARN proporciona una fuente de dianas terapéuticas novedosas.

25 Los microARN se transcriben por la ARN polimerasa II (pol II) o ARN polimerasa III (pol III). Ver Qi y otros (2006) Cellular & Molecular Immunology, Vol. 3: 411-19. Los microARN surgen a partir de los transcritos iniciales, denominados transcritos primarios microARN (pri-microARN), que generalmente son de miles de bases de longitud. Los pri-microARN se procesan en el núcleo por la RNasa Drosha en precursores en forma de horquilla, de aproximadamente 70 a aproximadamente 100-nucleótidos (pre-microARN). Después del transporte hacia el citoplasma, la horquilla pre-microARN se procesa adicionalmente por Dicer para producir un microARN maduro de doble cadena. Después la cadena de microARN madura se incorpora dentro del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde se asocia con sus ARNm diana mediante complementariedad de pares de base. En los casos relativamente raros en que un microARN aparea sus bases perfectamente con un ARNm diana, esto promueve la degradación del mRNA. Más comúnmente, los microARN forman heterodúplex imperfectos con los ARNm diana, lo que afecta o bien la estabilidad del ARNm o la inhibición de la traducción del mRNA.

40 Diversos estudios han caracterizado la expresión génica de los ARNm en MPM, y más recientemente, se generó el perfil de expresión de microARN, inicialmente para propósitos diagnósticos que usan muestras derivadas de líneas celulares normales y tumorales, tumores de MPM y grupos de pericardio normal o MPM y cáncer de pulmón. Se generaron, además, para propósitos pronósticos, *es decir*, dentro de los tumores de MPM de diversa clasificación. *Ver, por ejemplo*, Busacca y otros, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 42: 312-19 (2010). Sin embargo, nadie ha realizado una comparación extensa entre los tumores de MPM y los tejidos pleurales normales.

45 Además, los miméticos de microARN a la vez que se usan relativamente fácil *in vitro*, típicamente, sufren en términos de eficacia *in vivo*, debido a dos problemas: (1) pobre actividad (que incluye baja incorporación al RISC y efectos fuera de la diana) y (2) suministro ineficiente (relacionado a la estabilidad y a la distribución específica/selectiva en el sitio de acción).

50 Como se mencionó, diversos estudios han caracterizado la expresión génica en MPM. Esto ha sido con la intención de comprender el proceso de la enfermedad, así como también para identificar dianas potenciales. Estos estudios han caracterizado una regulación positiva general de los genes del ciclo celular y metabólico en MPM, con cambios adicionales en los genes apoptóticos asociados con una respuesta apoptótica alterada relacionada a la resistencia a la quimioterapia. Hasta la fecha, estos estudios tienen pendiente revelar el mecanismo general de control genético de los fenotipos comunes a los tumores de MPM. Sin embargo, como los microARN se consideran moduladores globales de la expresión génica, la regulación negativa de la expresión de los microARN representa una explicación potencial para la regulación positiva de familias de genes (*es decir*, la pérdida de la expresión de los microARN produce la regulación positiva de los genes diana).

60 Breve descripción de la invención

La invención se basa en parte en la identificación de una familia de microARN que están regulados negativamente en muestras de tumores de MPM en comparación con los tejidos de la pleura normal de individuos no afectados. En particular, los inventores descubrieron una marcada regulación negativa en la expresión de la familia de microARN miR-15/107 en los tejidos de MPM.

65

En consecuencia, el primer aspecto de la presente invención se refiere a un microARN de doble cadena que comprende (a) una secuencia madura que corresponde a un miembro de la familia miR-15/107; y (b) una cadena pasajero,

5 en donde la secuencia madura contiene AGCAGC en las posiciones 2-7 o 1-6 en el extremo 5' y en donde la secuencia madura comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en las sec. con núm. de ident.: 11-14.

La cadena pasajero puede comprender una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en las sec. con núm. de ident.: 15-18.

10 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un mimético de microARN de doble cadena de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para usar en el tratamiento del mesotelioma pleural maligno (MPM).

15 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un mimético de microARN de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para usar con el propósito de aumentar la sensibilidad de una célula cancerosa de MPM a una terapia anticáncer.

20 En la presente descripción se describe un método para tratar el MPM en un sujeto que padece la enfermedad. El método comprende administrar una cantidad eficaz de un mimético de microARN de doble cadena, como se describió anteriormente, donde tal administración mimetiza la expresión endógena de la familia miR-15/107, de esta manera en el sujeto se restaura la regulación de la expresión de los genes diana de la familia miR-15/107. La administración se efectúa, preferentemente, mediante el uso de una minicélula intacta de origen bacteriano para el suministro del mimético de miRNA. Conforme a la metodología, la etapa de administrar el mimético de microARN comprende la

25 coadministración simultánea o en serie de una terapia adyuvante anticáncer al sujeto.

30 En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para aumentar la sensibilidad de una célula cancerosa de MPM a los efectos citotóxicos de una terapia anticáncer. El método comprende administrar a la célula al menos un mimético de miRNA como se describió anteriormente, de manera que aumente la sensibilidad de la célula cancerosa de MPM.

Estos y otros aspectos de esta invención se describen posteriormente más abajo.

#### Breve descripción de los dibujos

35 De manera que la materia en la que las características enumeradas anteriormente, ventajas y objetos de la invención, así como también otras que serán evidentes, se logren y puedan comprenderse en detalle, descripciones más particulares y ciertas modalidades de la invención resumidas de manera breve anteriormente se ilustran en las figuras anexas. Estas figuras forman una parte de la especificación. Ellas ilustran modalidades particulares de la invención y, por lo tanto, no son limitantes de esta.

40 La Figura 1 representa la expresión de la familia miR-15/107 que se regula negativamente en líneas celulares y tumores de MPM.

La Figura 2 ilustra que la exposición continua a crisotilo reduce la expresión de microARN de la familia miR-15/107 en las células mesoteliales inmortalizadas MeT-5A.

45 La Figura 3 representa que la sustitución de la familia miR-15/16 conduce a la inhibición del crecimiento de las células de MPM *in vitro*.

La Figura 4 muestra que los miméticos que comprenden una secuencia correspondiente a la secuencia consenso del miR-15/107 son más efectivos que el miR-16 nativo en la inhibición de la proliferación de las células de MPM.

La Figura 5 ilustra que la transfección con miR-16 regula negativamente los genes diana.

La Figura 6 representa los efectos de miR-16 sobre la toxicidad de gemcitabina y pemetrexed en células de MPM.

50 La Figura 7 representa los efectos de la sustitución de miR-16 en MPM *in vivo*, suministrado como <sup>EGFR</sup>minicells<sub>miR-16</sub> (anticuerpo biespecífico dirigido, mimético de miR-16 empaquetado en minicélulas donde la secuencia de direccionamiento a células tumorales en el anticuerpo biespecífico se dirige al EGFR).

La Figura 8 muestra el efecto sobre el crecimiento tumoral *in vivo* de con15/107.2, un mimético derivado de la secuencia consenso de la familia miR-15/107.

#### 55 Descripción detallada de la invención

60 Como se indicó, un aspecto clave de la invención es la identificación de una familia de microARN que se regulan negativamente en muestras de tumores de MPM en comparación con tejido pleural normal de individuos no afectados. Por lo tanto, en el tejido del MPM se produce una disminución marcada de la expresión de microARN de la familia miR-15/107.

65 En la presente descripción se describe el diseño, la síntesis, la construcción, la composición, la caracterización y el uso de microARN terapéuticos correspondientes a la familia miR-15/107 para tratar el MPM. Más específicamente, la invención se dirige a miméticos de microARN que actúan para restaurar la expresión de la familia miR-15/107 en células tumorales de MPM, mediante imitación de la actividad de los miembros endógenos de la familia miR-15/107, de esta

manera se restablece el control del crecimiento de las células del MPM. Por lo tanto, los miméticos de microARN pueden usarse en un enfoque de terapia de sustitución para restaurar la expresión de la familia miR-15/107 en células de MPM.

5 En modalidades ilustrativas adicionales, los miméticos de microARN se modifican para mejorar la estabilidad, reducir los efectos fuera de la diana y aumentar la actividad. Las modalidades adicionales se refieren al uso de una minicélula para suministrar miméticos de microARN. En otro aspecto de la invención, los miméticos de microARN funcionan para potenciar la eficacia de otros fármacos usados clínicamente para el tratamiento del MPM.

10 La familia miR-15/107

La familia miR-15/107 se identificó previamente y se caracterizó como una superfamilia de microARN en la que cada miembro contiene la secuencia AGCAGC que comienza en el primer o segundo nucleótido a partir del extremo 5' de la cadena madura del microARN. Se cree que la familia miR-15/107 se involucra en la regulación de numerosas actividades celulares que representan puntos de intervención para la terapia del cáncer y para la terapia de otras enfermedades y trastornos. Ver Finnerty y otros (2010) J. Mol. Biol., Vol. 402: 491-509. Por ejemplo, se cree que la familia miR-15/107 se involucra en la regulación de la expresión génica que relaciona la división celular, el metabolismo, la respuesta al estrés y la angiogénesis en especies de vertebrados, así como también en cánceres humanos, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

La búsqueda de enfoques novedosos para desarrollar terapias del cáncer a menudo comienza con los intentos de identificar las diferencias entre el tejido normal y el tumoral para permitir el direccionamiento específico o selectivo a las células tumorales. Para el MPM esto ha resultado difícil ya que muchos cambios en la expresión génica, aunque son específicos de las células tumorales, o bien son imposibles de tratarse selectivamente (*es decir*, no medicables) o proporcionan una ventana terapéutica demasiado estrecha (*es decir*, se afectan las células normales). Además, modificar la expresión no siempre se correlaciona con el éxito del tratamiento. Si bien estudios previos indicaron que diversos microARN tienen funciones supresoras de tumores u oncogénicas en MPM, no se ha observado que estas funciones ocurran con frecuencia en una gran proporción de tumores o líneas celulares. En este contexto, el descubrimiento de que toda la familia de miR-15/107 se regula negativamente en todas las líneas celulares de MPM y tumores analizados (Figura 1) proporciona una base sólida para enfocarse en estos cambios como una aproximación terapéutica. Junto con los datos que muestran la regulación negativa inducida por amianto de la familia de microARN miR-15/107 (Figura 2), esto evidencia un papel causal importante de estos cambios en la biología del MPM. En este sentido, la identificación de la regulación negativa de la familia miR-15/107 es significativa por al menos dos razones: primero, es altamente específica para el MPM (el cambio se presenta en todas las muestras, Figura 1); segundo, el aumento de los niveles de la familia miR-15/107 afecta el crecimiento celular del MPM pero no tiene efecto sobre las células mesoteliales normales (Figura 3). Además, mediante el uso de un microARN como entidad terapéutica para el MPM se proporciona la capacidad de corregir, con un único agente, múltiples genes que se expresan de manera anormal (Figura 5) de esta manera disminuye la proliferación (Figura 3) y aumenta la sensibilidad del fármaco (Figura 6). Para formular los microARN que son capaces de restaurar la expresión de la familia miR-15/107, los inventores consideraron características tales como la similitud de secuencia para preparar un enfoque terapéutico eficaz de microARN.

La familia miR-15/107 comparte una secuencia semilla común, y por lo tanto los ARNm diana de cada miembro se superponen significativamente. Como se usa en la presente descripción, el término "familia de microARN" se refiere a un grupo de especies de miRNA que comparten identidad a través de al menos 6 nucleótidos consecutivos, denominados además como la "secuencia semilla", como se describió en Brennecke, J. y otros, PLoS biol 3 (3):pe85 (2005). Como se usa en esta descripción, "secuencia semilla" indica los nucleótidos en las posiciones 1-6, 1-7, 2-7 o 2-8 de una secuencia madura de miRNA. Típicamente, la secuencia semilla de microARN se localiza en el extremo 5' del miRNA. La frase "secuencia madura" se refiere a la cadena de un microARN procesado completamente que entra en el RISC.

En consecuencia, para los fines de la presente invención, la familia miR-15/107 comprende diez secuencias como las siguientes:

miR-15a-5p (sec. con núm. de ident.:1 uagcagcacauaugguuugug, MIMAT0000068);  
 55 miR-15b-5p (sec. con núm. de ident.:2 uagcagcacaucaugguuuaca, MIMAT0000417);  
 miR-16-5p (sec. con núm. de ident.:3 uagcagcacgaaauauuggcg, MIMAT0000069);  
 miR-195-5p (sec. con núm. de ident.:4 uagcagcacagaauauuggc, MIMAT0000461);  
 miR-424-5p (sec. con núm. de ident.:5 cagcagcauucauguuugaa, MIMAT0001341);  
 miR-497-5p (sec. con núm. de ident.:6 cagcagcacacugugguuugu, MIMAT002820);  
 60 miR-503-5p (sec. con núm. de ident.:7 uagcagcggaacaguucugcag, MIMAT0002874);  
 miR-646-5p (sec. con núm. de ident.:8 aagcagcugccucugaggc, MIMAT0003316);  
 miR-103a-3p (sec. con núm. de ident.:9 agcagcauuguacagggcuaua, MIMAT0000101); y  
 miR-107 (sec. con núm. de ident.:10 agcagcauuguacagggcuaua, MIMAT0000104).

65 Para controlar todas las dianas de la familia miR-15/107 de manera efectiva, en teoría, los diez miembros tendrían que reintroducirse en las células de MPM mediante el uso de miméticos de microARN específicos para cada secuencia

enumerada anteriormente. No obstante, este no es un enfoque eficiente para el tratamiento clínico. En cambio, la invención proporciona un enfoque de miméticos de microARN en el que se diseñó una secuencia consenso de toda la familia miR-15/107 que funciona como un mimético para realizar las funciones de la familia miR-15/107 endógena, de esta manera se restaura la expresión de la familia miR-15/107 en células de MPM (Figura 3). Como se usó en esta descripción, la frase "secuencia consenso" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comparte una secuencia de alta identidad estructural y/o funcional entre un grupo de secuencias. Con respecto a esto, un mimético de microARN que comprende una secuencia consenso es capaz de imitar las funciones de toda la familia miR-15/107. Por lo tanto, el diseño de una secuencia consenso de toda la familia miR-15/107 ofrece la ventaja de maximizar el número de dianas deseadas (*es decir*, los diez miembros de la familia miR-15/107) para los que puede imitarse la expresión endógena, mientras que al mismo tiempo se limita el número de miméticos a una sola entidad de secuencia.

En consecuencia, en modalidades específicas, los miméticos de microARN se usan como una forma de terapia de sustitución para tratar células de MPM, en donde los miméticos de microARN son capaces de realizar las funciones de la familia miR-15/107, de esta manera se restaura la expresión de la familia miR-15/107. Como tal, en el contexto de esta descripción, el término "restauración de la expresión" se refiere a la restauración de la expresión de la familia miR-15/107 mediante el uso de miméticos de microARN que son capaces de imitar las funciones de la familia miR-15/107 endógena.

#### Miméticos de microARN

Como se usa en la presente descripción, el término "mimético de microARN" se refiere a ARN sintéticos no codificantes que son capaces de entrar en la vía del ARNi y regular la expresión génica. Como se usa en la presente descripción, "microARN sintético" se refiere a cualquier tipo de secuencia de ARN, distinta de los microARN endógenos. Los miméticos de microARN imitan la función de los microARN endógenos y pueden diseñarse como moléculas maduras de doble cadena o precursores miméticos (*por ejemplo*, pri- o pre-microARN). Los miméticos de microARN pueden conformarse por híbridos de ARN, ADN, ARN-ADN modificados o no modificados, o alternativas químicas de ácidos nucleicos.

Como se describió anteriormente, la familia miR-15/107 comprende diez microARN que comparten la secuencia 5'-AGCAGC-3' en el extremo 5' terminal de la cadena activa (guía). El hecho de que todos los miembros de la familia miR-15/107 tengan la misma secuencia semilla proporciona una oportunidad para corregir la regulación global de la expresión génica con un solo mimético de microARN. En consecuencia, la invención proporciona miméticos de microARN correspondientes a la familia miR-15/107 que comprenden una secuencia consenso, en donde los miméticos de microARN son capaces de imitar la actividad de toda la familia miR-15/107 endógena. Por lo tanto, la restauración de la expresión de microARN se logra mediante el uso de estos miméticos de microARN.

Las secuencias consenso ilustrativas de la invención son como sigue:

con15/107.1 (sec. con núm. de ident.:11 UAGCAGCACAUAAUGGUUUGCG);  
 con15/107.2 (sec. con núm. de ident.:12 UAGCAGCACAUAAUGGUUUGCGGA);  
 con15/107.3 (sec. con núm. de ident.:13 UAGCAGCACAUAAUGGUUUGCU); y  
 con15/107.4 (sec. con núm. de ident.:14 UAGCAGCACAGUAUGGUUUGCG).  
 con15/107.1, complemento A (sec. con núm. de ident.:15 CGCAAACCAUUAUGUGCUGCUA);  
 con15/107.2, complemento A (sec. con núm. de ident.:16 UCCGCAAACCAUUAUGUGCUGCUA);  
 con15/107.3, complemento A (sec. con núm. de ident.:17 AGCAAACCAUUAUGUGCUGCUA);  
 con15/107.4, complemento A (sec. con núm. de ident.:18 CGCAAACCAUACUGUGCUGCUA);  
 con15/107.1, complemento B (sec. con núm. de ident.:19 CGCAAACCAUUAUGUGCUGCUU);  
 con15/107.2, complemento B (sec. con núm. de ident.:20 UCCGCAAACCAUUAUGUGCUGCUU);  
 con15/107.3, complemento B (sec. con núm. de ident.:21 AGCAAACCAUUAUGUGCUGCUU);  
 con15/107.4, complemento B (sec. con núm. de ident.:22 CGCAAACCAUACUGUGCUGCUU);  
 con15/107.1, complemento C (sec. con núm. de ident.:23 CGCAAACCAUUAUGUGCUGCUUUA);  
 con15/107.2, complemento C (sec. con núm. de ident.:24 UCCGCAAACCAUUAUGUGCUGCUUUA);  
 con15/107.3, complemento C (sec. con núm. de ident.:25 AGCAAACCAUUAUGUGCUGCUUUA);  
 con15/107.4, complemento C (sec. con núm. de ident.:26 CGCAAACCAUACUGUGCUGCUUUA);  
 con15/107.1, complemento D (sec. con núm. de ident.:27 CGCAAACCAUUAUGUGCUGCUUUA);  
 con15/107.2, complemento D (sec. con núm. de ident.:28 UCCGCAAACCAUUAUGUGCUGCUUUA);  
 con15/107.3, complemento D (sec. con núm. de ident.:29 AGCAAACCAUUAUGUGCUGCUUUA); y  
 con15/107.4, complemento D (sec. con núm. de ident.:30 CGCAAACCAUACUUGUGCUGCUUUA).

Una modalidad preferida de la invención comprende una secuencia consenso de microARN sintético ("guía") en su totalidad o en parte (sec. con núm. de ident.: 11-14), junto con la secuencia complementaria como una cadena pasajero (sec. con núm. de ident.: 15-18). Además, se contempla en la invención un mimético de ARN de doble cadena en el que se incorporan desapareamientos terminales y/o abultamientos internos entre la cadena guía y la cadena pasajero, que se introducen para aumentar la carga de RISC, (*ver las sec. con núm. de ident.: 21-30*). Además, se contemplan otras variaciones de la secuencia correspondiente a la secuencia consenso de todos los miembros de la familia, donde la secuencia semilla AGCAGC está presente dentro de los primeros 7 nucleótidos de la cadena guía, *es decir*, las

posiciones 1-6 o las posiciones 2-7. Los expertos en la técnica comprenderán que otras variaciones pueden promover la carga del RISC para aumentar la actividad. A modo de ejemplo, estas incluyen un saliente de uno o dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena guía; un nucleótido de ADN (u otra modificación química) en el extremo 3' de la cadena pasajero.

5

#### Modificaciones Químicas

Generalmente, se ha encontrado que los miméticos de microARN son ineficaces en los usos operativos. Con respecto a esto, para mejorar la eficacia, la presente invención emplea un mimético de microARN que comprende un ARN de doble cadena modificado de manera estructural y químicamente. En modalidades representativas, para superar las limitaciones de los miméticos de microARN, se han introducido modificaciones químicas no tóxicas a la secuencia mimética para mejorar la estabilidad, reducir los efectos fuera de la diana y aumentar la actividad.

10

En una modalidad, el mimético de microARN incluye un dúplex de ARN que comprende la secuencia madura de microARN y una cadena pasajero. En un aspecto, la cadena pasajero se modifica estructural y químicamente para permitir la retención de la actividad del mimético dúplex a la vez que se inactiva la cadena pasajero, de esta manera se reducen los efectos fuera de la diana. En un aspecto adicional, la modificación química inhibe la actividad nucleasa, de esta manera aumenta la estabilidad.

15

En modalidades particulares, los miméticos de microARN de la invención contemplan el uso de nucleótidos que se modifican para potenciar sus actividades. Tales nucleótidos incluyen aquellos que están en los extremos 5' o 3' del ARN así como también aquellos que están internos dentro de la molécula. Los nucleótidos modificados usados en las cadenas complementarias de los microARN bloquean el 5'OH o el fosfato del ARN, o introducen modificaciones del azúcar interna que evitan la captación y la actividad de la cadena inactiva del microARN. Las modificaciones para los microARN inhibidores incluyen modificaciones del azúcar interna que mejoran la hibridación así como también estabilizan las moléculas en las células y las modificaciones terminales que estabilizan aún más los ácidos nucleicos en las células. Además, se contemplan modificaciones que pueden detectarse mediante microscopía u otros métodos para identificar células que contienen los microARN.

20

25

En otros aspectos, las modificaciones pueden hacerse a la secuencia de un microARN o un pre-microARN sin alterar la actividad del microARN. Como se usa en la presente descripción, el término "variante funcional" de una secuencia de microARN se refiere a una secuencia de oligonucleótidos que difiere de la secuencia natural del microARN, pero retiene una o más características funcionales del microARN (*por ejemplo*, aumento de la susceptibilidad de las células cancerosas a agentes quimioterapéuticos, inhibición de la proliferación de las células cancerosas, inducción de apoptosis en las células cancerosas, inhibición de la diana específica del microARN). En algunas modalidades, una variante funcional de una secuencia de microARN retiene todas las características funcionales del microARN. En ciertas modalidades, una variante funcional de un microARN tiene una secuencia de bases nucleotídicas que es al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al microARN o precursor de este en una región de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más bases nucleotídicas, o que la variante funcional hibrida con el complemento del microARN o precursor de este bajo condiciones de hibridación rigurosas. En consecuencia, en ciertas modalidades, la secuencia de bases nucleotídicas de una variante funcional puede ser capaz de hibridar con una o más secuencias diana del microARN.

30

35

40

En algunas modalidades, la cadena complementaria se modifica de modo que un grupo químico distinto de un fosfato o hidroxilo esté en su extremo 5'. La presencia de la modificación 5' aparentemente elimina la captación de la cadena complementaria y subsecuentemente favorece la captación de la cadena activa por el complejo de proteína del microARN. La modificación 5' puede ser cualquiera de una diversidad de moléculas conocidas en la técnica, que incluyen NH<sub>2</sub>, NHCOCH<sub>3</sub>, y biotina.

45

En otra modalidad, la captación de la cadena complementaria por la vía del microARN se reduce mediante la incorporación de nucleótidos con modificaciones en el azúcar en los primeros 2-6 nucleótidos de la cadena complementaria. Debe señalarse que tales modificaciones en el azúcar pueden combinarse con las modificaciones 5' terminales descritas anteriormente para potenciar adicionalmente la actividad del microARN. Las modificaciones en el azúcar contempladas en los miméticos de microARN incluyen, pero no se limitan a, un grupo sustituto del azúcar seleccionado de: F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenoilo; O-, S- o N-alquiniilo; o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alquenoilo y alquiniilo pueden ser alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> o alquenoilo y alquiniilo C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> sustituidos o no sustituidos. En algunas modalidades, estos grupos pueden elegirse a partir de: O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>OCH<sub>3</sub>, O((CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>)<sub>y</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>ONH<sub>2</sub> y O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>ON((CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, donde la x y la y son desde 1 hasta 10.

50

55

Las porciones de bases alteradas o las porciones de azúcar alteradas incluyen, además, otras modificaciones consistentes con el propósito de un mimético de microARN. Tales compuestos oligoméricos se describen mejor como que son estructuralmente distinguibles de, pero funcionalmente intercambiables con, oligonucleótidos naturales o sintéticos no modificados. Como tal, se contempla que todos estos compuestos oligoméricos se comprenden por esta invención siempre que funcionen eficazmente para imitar la estructura o función de una cadena de oligonucleótidos de ARN deseada correspondiente a la familia miR-15/107.

60

En algunas modalidades, la cadena complementaria se diseña de modo que los nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria no son complementarios a la cadena activa. Esto resulta en ARN híbridos de doble cadena que son estables en el extremo 3' de la cadena activa pero relativamente inestables en el extremo 5' de la cadena activa. Esta diferencia en la estabilidad mejora la captación de la cadena activa por la vía del microARN, mientras que reduce la captación de la cadena complementaria, de esta manera se mejora la actividad del microARN.

Con respecto a otras modificaciones, contempladas para usar en la práctica de la invención, ver además la descripción en la Pub. de la patente de los EE.UU. núm. 2012/0259001 que la adición de modificaciones de 2'-O-metilo a la cadena sentido del mimético de miRNA, *entre otras*, puede tener efectos negativos en esta molécula. El mejoramiento de estos efectos negativos es un mimético de miRNA que comprende (i) una cadena sentido que varía en tamaño de aproximadamente 16 a aproximadamente 31 nucleótidos en la que aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 % de los nucleótidos de la cadena sentido se modifican químicamente; (ii) una cadena antisentido que varía en tamaño desde aproximadamente 16 a aproximadamente 31 nucleótidos en la que aproximadamente 40 % a aproximadamente 90 % de los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos químicamente modificados; y (iii) al menos uno de un desapareamiento entre el nucleótido 1 en la cadena antisentido y el nucleótido opuesto en la cadena sentido; y un desapareamiento entre el nucleótido 7 en la cadena antisentido y el nucleótido opuesto en la cadena sentido. Además en este contexto es ventajoso, como se describe, la unión a la cadena sentido del mimético de miRNA, a través de una molécula enlazadora que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 átomos de longitud, de una porción conjugada seleccionada a partir del grupo que consiste en colesterol, colestanol, estigmasterol, ácido colánico y ergosterol. La molécula enlazadora puede ser de 5 a 8 átomos de longitud, por ejemplo, y la molécula enlazadora puede unir la porción conjugada al extremo 3' de la cadena sentido.

En algunas modalidades, las secuencias de microARN de la invención pueden asociarse con una segunda secuencia de ARN que puede localizarse en la misma molécula de ARN o en una molécula de ARN separada como la secuencia de microARN. En tales casos, la secuencia de microARN puede denominarse como la cadena activa, mientras que la secuencia de ARN codificada, que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de microARN, puede denominarse como cadena complementaria. Las cadenas activas y complementarias pueden hibridarse para generar un ARN de doble cadena que es similar a un precursor de microARN de origen natural. La actividad de un microARN puede optimizarse mediante el aumento máximo de la captación de la cadena activa y mediante la disminución de la captación de la cadena complementaria por el complejo de proteína del microARN que regula la traducción génica. Esto puede hacerse, por ejemplo, a través de la modificación y/o el diseño de la cadena complementaria.

Un ácido nucleico puede producirse mediante cualquier técnica conocida por un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. En algunas modalidades, las composiciones de microARN de la invención se sintetizan químicamente.

Una modalidad preferida tiene un conjunto particular de tales modificaciones. Estas son modificaciones químicas de 2 a 6 nucleótidos en cada extremo de la cadena pasajero con azúcares modificados con 2'-O-metilo, e incluyen cualquier combinación de 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos modificados en el extremo 5' de la cadena pasajero con 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos modificados en el extremo 3' de la cadena pasajero. Las estrategias alternativas de modificación química que imparten una funcionalidad similar serán evidentes para los expertos en la técnica.

#### Método de Administración

Los miméticos de microARN pueden administrarse a un sujeto por cualquier medio adecuado para suministrar estos compuestos a las células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los miméticos de microARN pueden administrarse por métodos adecuados para transfectar las células del sujeto con los miméticos, o con ácidos nucleicos que comprenden las secuencias que codifican estos compuestos. En una modalidad, las células se transfectan con un vector plasmídico o viral que comprende las secuencias que codifican un mimético de microARN.

En una modalidad particular de la invención, para evadir los problemas asociados con el suministro ineficaz *in vivo*, se proporciona, preferentemente, un mimético de acuerdo con la invención para el suministro a través del sistema "EnGeneIC Delivery Vehicle" sistema desarrollado por EnGeneIC Molecular Delivery Pty Ltd (Sydney), que se basa en el uso de minicélulas intactas de origen bacteriano. El sistema EDV™ se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales publicadas WO 2006/021894 y WO 2009/027830.

En una modalidad ilustrativa, por lo tanto, se proporcionan los miméticos de microARN descritos en la presente descripción para la administración mediante el uso de minicélulas intactas de origen bacteriano. Estas minicélulas se suministran específicamente a los tejidos diana, mediante el uso de anticuerpos biespecíficos. Un brazo de dicho anticuerpo tiene especificidad para el tejido diana, mientras que el otro tiene especificidad para la minicélula. El anticuerpo lleva las minicélulas a la superficie de la célula diana, y después las minicélulas se introducen en la célula mediante endocitosis. Después de la absorción en la célula tumoral, hay una liberación del contenido de la minicélula, es decir, del mimético(s) de microARN. Para un anticuerpo, con respecto a esto, la especificidad contra cualquier marcador de superficie celular para el MPM podría usarse de acuerdo con la invención. Por lo tanto, en el presente contexto, ilustrativo de tal especificidad adecuada para un anticuerpo biespecífico podría ser una especificidad para la

mesotelina humana, expresada en el 100 % de mesoteliomas epitelioides, para la cual están en desarrollo anticuerpos terapéuticos (ver Kelly y otros, Mol. Cancer Ther. 11: 517-22 (2012)), o para intelectin-1, que se expresa específicamente en MPM y en las células globet gastrointestinales (ver Washimi y otros, PLoS One 7: e39889 (2012)).

5 Otros métodos de administración de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica. En particular, las rutas de administración que ya se usan para los agentes terapéuticos de ácidos nucleicos, junto con las formulaciones en uso actual, proporcionan las rutas preferidas de administración y formulación para los ácidos nucleicos. Las composiciones de ácido nucleico pueden administrarse mediante diversas rutas que incluyen, pero no se limitan a: oral, intravenosa, intrapleural, intraperitoneal, intramuscular, transdérmica, subcutánea, tópica, sublingual o rectal.

10 Los ácidos nucleicos pueden administrarse, además, a través de liposomas o nanopartículas. Tales rutas de administración y formulaciones apropiadas generalmente se conocen por los expertos en la técnica. La administración de las formulaciones descritas en la presente descripción puede realizarse mediante cualquier método aceptable que permita que el microARN o ácido nucleico que codifica el microARN alcance su diana. El modo particular seleccionado dependerá por supuesto, de factores ilustrativos tales como la formulación particular, la gravedad del estado del sujeto a tratar, y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Como se usa generalmente en la presente descripción, una "cantidad efectiva" de un ácido nucleico es la cantidad que es capaz de tratar uno o más síntomas de cáncer o enfermedad relacionada, revertir la progresión de uno o más síntomas de cáncer o enfermedad relacionada, detener la progresión de uno o más síntomas de cáncer o enfermedad relacionada, o prevenir la ocurrencia de uno o más síntomas de cáncer o enfermedad relacionada en un sujeto al que se administra la formulación, en comparación con un sujeto control pareado que no recibe el compuesto o agente terapéutico. Las cantidades efectivas reales del fármaco pueden variar de acuerdo con el fármaco específico o una combinación de estos que se utilicen, la composición particular formulada, el modo de administración y la edad, peso, estado del sujeto y gravedad de los síntomas o afección que se trata.

25 Otros sistemas de suministro adecuados incluyen, pero no se limitan a, sistemas de suministro de liberación por tiempo, liberación retardada, liberación sostenida o liberación controlada. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas en muchos casos, lo que aumenta la comodidad para el sujeto y el médico. Muchos tipos de sistemas de suministro para la liberación están disponibles y se conocen por los expertos en la técnica. Incluyen, por ejemplo, sistemas basados en polímeros tales como ácidos poliláctico y/o poliglicólico, polianhídridos, policaprolactonas, copolioxalatos, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y/o combinaciones de estos.

30 Las composiciones farmacéuticas que contienen miméticos de microARN pueden comprender, además, excipientes farmacéuticos y/o aditivos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones y agentes de ajuste del pH. Los aditivos adecuados incluyen, *por ejemplo*, tampones fisiológicamente biocompatibles (*por ejemplo*, hidrocloreto de trometamina), adiciones de quelantes (*por ejemplo*, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de quelato de calcio (*por ejemplo*, DTPA de calcio, CaNaDTPA-bisamida), u opcionalmente, adiciones de calcio o sales de sodio (*por ejemplo*, cloruro de calcio, ascorbato de calcio, gluconato de calcio o lactato de calcio).

#### 40 Dosificación

45 Como la relación entre la pérdida de la expresión de microARN y el MPM es constante en todas las muestras, un aspecto de la invención se dirige a un mimético de microARN de la invención para usar en la sustitución de microARN en células tumorales de MPM. En este aspecto, en base a los experimentos iniciales en animales, se contempla que la progresión de MPM se detendrá por el tratamiento con los miR que contienen el miR de la invención. En aspectos adicionales, se contempla que el mimético de la invención se proporciona para la administración como dosis múltiples a lo largo de un marco de tiempo continuo. En algunos aspectos, aunque el mimético de la invención proporcionado para la administración como una dosis por semana puede tener un efecto adecuadamente eficaz, algunos sujetos pueden demostrar efectos más marcadamente eficaces en respuesta a un aumento en la frecuencia y/o al aumento de la dosificación.

50 En otra modalidad de la invención, proporcionar la administración para la dosificación crónica será capaz de lograr el control de la enfermedad MPM. En aún otras modalidades, se contempla que las células tumorales del MPM que reciben miméticos de microARN experimentarán una detención permanente del crecimiento. Con respecto a esto, la detención de manera permanente del crecimiento puede atribuirse al mecanismo de acción de los miméticos de microARN (regulación negativa de los genes que promueven el ciclo celular y el metabolismo, genes antiapoptóticos promotores de supervivencia y genes de resistencia a los fármacos) y a consecuencias fenotípicas (detención del ciclo celular). Por lo tanto, se contempla el tratamiento continuo, de acuerdo con un aspecto de la invención, para inducir el control o mantenimiento de la enfermedad (*es decir*, enfermedad estable). De acuerdo con el aspecto de la invención, se contempla la regresión tumoral (*es decir*, una respuesta parcial/completa) donde los tumores del MPM experimentan una detención permanente del crecimiento celular.

60 Además, como se analiza con más detalle más abajo, los miméticos de microARN de la invención funcionan, además, para sensibilizar las células a las terapias convencionales contra el cáncer, tales como quimioterapia y radiación. En

este aspecto, se contempla que combinar los miméticos con la quimioterapia proporcionará efectos terapéuticos adicionales.

Con todos los tratamientos actuales para el MPM, la respuesta a la terapia es invariablemente seguida de una recaída. Por lo tanto, en aún otro aspecto de la invención, se contempla que los tumores retendrán este perfil de expresión en el momento de la recaída en vista de la relación entre la expresión de microARN y el MPM. Con respecto a esto, una recaída como se describió permitirá repetir el tratamiento con los mismos miméticos de microARN descritos en la presente descripción. En esta modalidad, la supresión tumoral a largo plazo cambia la naturaleza de la enfermedad y potencialmente cambia el MPM a una forma de enfermedad crónica.

En otros aspectos, las dosificaciones para un sujeto particular pueden determinarse por un experto en la técnica mediante el uso de consideraciones convencionales (*por ejemplo*, por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado). Un médico puede, por ejemplo, prescribir al principio una dosis relativamente baja, y subsecuentemente aumentar la dosis hasta que se obtenga una respuesta apropiada. La dosis administrada a un sujeto es suficiente para efectuar una respuesta terapéutica beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo, o, *por ejemplo*, para reducir los síntomas u otra actividad apropiada, en dependencia de la aplicación. La dosis se determina por la eficacia de la formulación particular, y la actividad, estabilidad o tiempo de vida media en suero del microARN empleado y la condición del sujeto, así como también el peso del cuerpo o el área superficial del sujeto a tratar. Además, la magnitud de la dosis se determina por la existencia, la naturaleza y el alcance de los efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un vector particular y la formulación, en un sujeto particular.

#### Terapia de Combinación

Los miméticos de microARN descritos en la presente descripción pueden complementar las condiciones de tratamiento mediante cualquier terapia convencional conocida, que incluye, pero no se limita a, administración de anticuerpos, administración de vacunas, administración de agentes citotóxicos, polipéptidos de aminoácidos naturales, ácidos nucleicos, análogos de nucleótidos y modificadores de la respuesta biológica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente. Por ejemplo, los miméticos de microARN pueden proporcionarse, además, para la administración en cantidades con eficacia terapéutica como una porción de un coctel contra el cáncer. Un coctel contra el cáncer es una mezcla de mimético(s) de microARN con uno o más fármacos anticancerosos además de un portador farmacéuticamente aceptable para el suministro. El uso de cocteles contra el cáncer como tratamiento para el cáncer es habitual.

En una modalidad, se prevé usar un mimético de microARN en combinación con otras modalidades terapéuticas. Por lo tanto, además de las terapias de microARN descritas anteriormente, puede proporcionarse al sujeto más terapias "estándar" tales como, pero sin limitarse a, agentes terapéuticos convencionales contra el cáncer.

Los fármacos anticancerosos que se conocen bien en la técnica y pueden usarse como un tratamiento en combinación con los ácidos nucleicos descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a: actinomicina D, aminoglutetimida, asparaginasa, bleomicina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino (cis-DDP), ciclofosfamida, citarabina HCl (arabinósido de citosina), dacarbazina, factinomicina, daunorubicina HCl, doxorubicina HCl, fosfato sódico de Estramustina, etopósido (VP 16-213), floxuridina, 5-fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxiurea (hidroxicarbamida), Ifosfamida, Interferón afa-2a, interferón alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo del factor liberador LHRH), lomustina, mecloretamina HCl (mostaza nitrogenada), melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato (MTX), mitomicina, mitoxantrona HCL, octreótido, plicamicina, procarbazona HCL, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, amsacrina, azacitidina, hexametilmelamina, interleucina-2, mitoguazona, pentostatina, semustina, tenipósido, y sulfato de vindesina.

Los agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, pueden ser agentes que directamente forman uniones cruzadas con el ADN, agentes que se intercalan en el ADN y agentes que conducen a aberraciones cromosómicas y mitóticas porque afectan la síntesis de los ácidos nucleicos. {ut}Se contemplan los agentes que forman uniones cruzadas con los ácidos nucleicos, específicamente el ADN, y se muestran en la presente descripción, para producir un daño en el ADN que conduce a una combinación antineoplásica sinérgica. Pueden usarse agentes tales como cisplatino y otros agentes alquilantes de ADN. Además, los agentes que dañan el ADN incluyen, compuestos que interfieren con la replicación del ADN, la mitosis y la segregación cromosómica. Los ejemplos de estos compuestos incluyen adriamicina (conocida además como doxorubicina), VP-16, conocido además como etopósido, verapamilo, podofilotoxina y similares. Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos incluyen al menos 1) antibióticos, tales como doxorubicina, daunorubicina, mitomicina, Actinomicina D; 2) agentes basados en platino, tales como cisplatino; 3) alcaloides de las plantas, tales como taxol, vincristina y vinblastina; 4) agentes alquilantes, tales como carmustina, melfalán, ciclofosfamida, clorambucilo, busulfán y lomustina.

En modalidades ilustrativas de la invención, los miméticos de microARN pueden proporcionarse para la administración como un agente único, pero pueden usarse, además, en combinación con otros fármacos, *por ejemplo*, pemetrexed, cisplatino (o carboplatino), y gemcitabina, etc.

Las terapias de combinación pueden lograrse al contactar células tumorales de MPM con una composición única o una formulación farmacológica que incluye uno o más miméticos de microARN y un segundo agente terapéutico contra el cáncer, o al contactar la célula tumoral con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en donde una composición incluye uno o más miméticos de microARN y la otra incluye el segundo agente terapéutico contra el cáncer. Alternativamente, la administración de uno o más miméticos de microARN puede preceder o seguir a la administración del otro agente terapéutico contra el cáncer en intervalos que varían de minutos a semanas. En las modalidades donde el otro agente terapéutico contra el cáncer y uno o más miméticos de microARN se aplican al sujeto separadamente, generalmente podría asegurarse que un período significativo de tiempo no expire entre el tiempo de cada suministro, de manera que el agente terapéutico contra el cáncer y el uno o más miméticos de microARN podrían aún ser capaces de ejercer ventajosamente un efecto combinado sobre la célula tumoral.

Otros agentes terapéuticos farmacológicos y métodos de administración, dosificaciones, etc., se conocen bien por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, the "Physicians Desk Reference," Klaasen's "The Pharmacological Basis of Therapeutics," "Remington's Pharmaceutical Sciences," y "The Merck Index, Oncena Edición,"), y pueden combinarse con la invención a la luz de las descripciones en la presente descripción. Algunas variaciones en la dosificación ocurrirán necesariamente en dependencia de la afección del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual, y tales determinaciones individuales están dentro de la experticia de los expertos en la técnica.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Descubrimiento de la Expresión Reducida de la Familia miR-15/107 en MPM

Los microARN tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer y su expresión está desregulada en tumores, que incluye el MPM. Los inventores identificaron cambios en la expresión de miR-16 en líneas celulares de MPM y en un pequeño conjunto de muestras tumorales, y evaluaron, además, la expresión de los microARN relacionados de toda la familia miR-15/107 en líneas celulares de MPM y en un conjunto más grande de muestras tumorales (Figura 1).

Se comparó un panel de 7 líneas celulares de MPM con una línea celular mesotelial MeT-5A. Las células se obtuvieron de la ATCC (H28, H2052, H2452, H226 y MSTO-211H) y de colaboradores (MM05 y Ren) y se cultivaron en el medio recomendado a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se aisló el ARN total de las células (crecidas al 80 % de confluencia) mediante el uso de TriZOL® (Life Technologies). Sesenta muestras tumorales consistentes en bloques fijados en formalina y embebidos en parafina. La expresión tumoral de microARN se comparó con 23 muestras de tejido pleural normal fijadas en formalina. Para aislar el ARN de las muestras tumorales, un patólogo experimentado marcó el contenido del tumor en las láminas teñidas con H&E, de cada bloque que se utilizó, como una guía para la microdissección por captura con láser para enriquecer el contenido tumoral. Brevemente, las muestras se montaron en portaobjetos de membrana (Zeiss), y la LCM se realizó mediante el uso del sistema PALM (Zeiss). El tejido capturado se recogió en tubos de recolección adhesivos, y se realizó la desparafinización en xileno. El ARN se extrajo de las muestras tumorales capturadas y de los tejidos normales mediante el uso del estuche FFPE RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN de las líneas celulares y las muestras de tejido se cuantificó mediante el uso de un nanofotómetro con lecturas a 260 y 280 nm. Tanto para muestras de líneas celulares como de tumores, la transcripción inversa (RT) utilizó cebadores de bucle y tallo específicos de microARN (Life Technologies). Se usaron 100 ng de ARN total como molde en la reacción de RT, que incluye, además, 4 µl de la mezcla de cebadores RT (con hasta 10 cebadores de RT específicos de microARN multiplexados en una mezcla equimolar), y la reacción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un volumen de 10 µl. El ADN complementario (ADNc) resultante se diluyó mediante la adición de 57.8 µl de agua, y a partir de esta dilución, se añadieron 2.25 µl de ADNc como molde para la reacción de qPCR. Además, el qPCR contenía cebadores/sondas TaqMan específicos de microARN y la mezcla master TaqMan GeneExpression (ambos de Life Technologies) con un volumen de reacción total de 10 µl. Las reacciones se establecieron manualmente y se ejecutaron por duplicado en una máquina de PCR en tiempo real Mx3000P (Stratagene) con 10 minutos a 95 °C de activación enzimática seguido de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 60 segundos templado/elongación a 60 °C. Los valores C<sub>q</sub> (ciclo de cuantificación) se determinaron mediante la aplicación de algoritmos de umbral basados en la base adaptativa y en el fondo mediante el uso del programa MxPro. El análisis de los resultados del qPCR se realizó mediante el uso del método 2<sup>-ΔΔC<sub>q</sub></sup> (como se describió por Livak y otros), e incluyó la normalización con respecto a los niveles de expresión de RNU6B. La expresión en cada muestra se calculó con relación a la expresión promedio de los controles.

De los diez microARN en la familia miR-15/107, se detectaron 6 en todas las muestras (miR-16, miR-15a, miR-15b, miR-195, miR-103 y miR-107), y no se detectaron 4 (miR-424, miR-497, miR-503 y miR-646). En las líneas celulares, se observó un promedio de regulación negativa de 2 a 5 veces de todos los seis microARN detectables en comparación con la expresión en células mesoteliales normales inmortalizadas (Figura 1). En los tumores se regularon negativamente, miR-16, miR-15a, miR-15b y miR-195 en un promedio de 8- a 25 veces, mientras que miR-103 y miR-107 se regularon negativamente de 4 a 6 veces, en comparación con los niveles de estos microARN en la pleura normal (*id.*).

Ejemplo 2

Reducción de la Expresión de la Familia miR-15/107 ante la Exposición de las Células de MPM a las Fibras de Amianto Crisotilo

5 El amianto es el agente etiológico en el MPM, pero se desconocen los efectos sobre la expresión de microARN. Los cambios observados después de la exposición al amianto sugerirían un papel causal en la biología del MPM. El trabajo previo en el campo se enfocó en los efectos de la exposición aguda a concentraciones citotóxicas de fibras de amianto sobre las células. Aun cuando se observan cambios en la expresión génica en estos casos, el resultado predominante de tal tratamiento es una combinación de apoptosis y necrosis que conduce a citotoxicidad extensa y muerte celular.

10 Para identificar los efectos fisiológicamente relevantes de la exposición al amianto sobre la expresión de microARN en células mesoteliales, las células MeT-5A se expusieron continuamente a las fibras de amianto crisotilo. Las células MeT-5A se cultivaron en las condiciones de cultivo recomendadas en presencia de 0, 0.1 o 1 µg de fibras de amianto crisotilo continuamente durante 3 meses. En los puntos de tiempo indicados, las células se cosecharon y se aisló el ARN para medir la expresión de microARN. El aislamiento del ARN y RT-qPCR se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Los niveles de microARN se normalizaron respecto a la expresión de U6 y se expresaron con relación a la expresión normalizada en células no tratadas. La Figura 2 demuestra que la exposición continua al amianto a 1 µM conduce a una disminución de la expresión de miR-16, miR-15b, miR-195, miR-103 y miR-107 en todos los puntos de tiempo, y la expresión de miR-15a disminuye a partir de 70 días en adelante. Estos resultados son los primeros en vincular la exposición al amianto con los cambios en la expresión de microARN en general, y el primero en analizar los cambios en la expresión génica relacionados con la exposición al amianto a largo plazo. Estos resultados proporcionan un vínculo directo entre la exposición al amianto y la expresión de la familia miR-15/107, y por lo tanto, sugieren que estos pueden ser cambios tempranos e importantes en la progresión del MPM.

Ejemplo 3

Sustitución de la familia miR-15/107 conduce a la inhibición del crecimiento de células de MPM *in vitro*

30 Para determinar los efectos de la sustitución de los miembros de la familia miR-15/107 en el crecimiento de células de MPM, las líneas celulares de MPM se transfectaron con miméticos de microARN y se midió el efecto sobre el crecimiento celular. Los miméticos consisten en ARN de doble cadena correspondiente a las secuencias maduras de miR-16, miR-15a o miR-15, o una secuencia sintética correspondiente a la secuencia consenso de la familia miR-15/107, y se proporcionaron como dúplex liofilizados purificados por HPLC (Shanghai GenePharma). Los miméticos se suspendieron en agua a una concentración de 20 µM. Después, estos se transfectaron de forma inversa en células mediante el uso de Lipofectamina RNAiMAX ('LRM', Life Technologies) a las concentraciones indicadas. Primero, se generaron los lipoplexos mediante la mezcla de la concentración apropiada del mimético en medio sin suero con un volumen igual de una solución al 1 % de LRM en medio sin suero, y se incubaron durante 20 a 120 minutos a temperatura ambiente. Los lipoplexos se distribuyeron en réplicas en placas de múltiples pocillos y se añadieron las células en suspensión (medio que contenía FCS al 10 %) a la mezcla lipoplex en cada pocillo de manera que la densidad final de las células fue de 7500/cm<sup>2</sup>. La transfección se dejó transcurrir durante 24 horas, después de lo cual el medio se sustituyó con medio fresco que contiene FCS al 10 % y las células se incubaron adicionalmente a 37 °C hasta la cosecha. A continuación, se cosecharon las réplicas de las placas a las 48, 72, 96 y 120 horas después de la transfección, lo que implicó eliminar el medio y congelar las placas a -80 °C. Al final del experimento, las placas se descongelaron y se añadieron, a cada pocillo, 150 µl de tampón de lisis que contiene SYBR Green 0.01 % para medir el contenido de ADN. Después de la incubación durante toda la noche en la oscuridad, el contenido de ADN se cuantificó mediante la medición de la fluorescencia en un fluorímetro Fluostar Optima, ajustado para una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm. En este ensayo la fluorescencia total (*es decir* el ADN por pocillo) muestra una relación lineal con el número de células, lo que permite determinar la proliferación.

50 La Figura 3 muestra que después de la transfección con los miméticos de microARN correspondientes en secuencia a miR-15a, miR-15b o miR-16, hubo una disminución, dependiente de la dosis y del tiempo, en la proliferación en 4 líneas celulares de MPM (H28, MM05, H2052 y MSTO). No hubo ningún efecto de estos tratamientos en la línea celular mesotelial normal MeT-5A. Por lo tanto, la restauración de la expresión de microARN y, por lo tanto, el control de la expresión del gen diana resultó, específicamente, en la inhibición de la proliferación de células de MPM.

Para investigar adicionalmente los efectos de la familia miR-15/107 en células de MPM, se diseñaron miméticos que corresponden a la secuencia consenso de la familia. Los miméticos consenso aparecen más abajo.

60 Tabla 1

| Miméticos   | Sentido (pasajero)              | Antisentido (Guía)       |
|-------------|---------------------------------|--------------------------|
| con15/107.1 | mCmGmCmAAACCAUUAUGUGCmGmCmUmA   | UAGCAGCACAUAAUGGUUUGCG   |
| con15/107.2 | mUmCmCmGCAAACCAUUAUGUGCmGmCmUmA | UAGCAGCACAUAAUGGUUUGCGGA |

| Miméticos   | Sentido (pasajero)             | Antisentido (Guía)     |
|-------------|--------------------------------|------------------------|
| con15/107.3 | mAmGmCmAAACCAUUAUGUGCUmGmCmUmA | UAGCAGCACAUAAUGGUUUGCU |
| con15/107.4 | mCmGmCmAAACCAUACUGUGCUmGmCmUmA | UAGCAGCACAGUAUGGUUUGCG |

Estas secuencias consenso variaron en dependencia del número de microARN incluidos en el alineamiento, que varió desde la familia miR-15 solamente (con15/107.1) hasta la familia 15/107 completa (con15/107.2 a 4). La longitud de la secuencia consenso en con15/107.3 se incrementó para que contara como la secuencia madura más larga de algunos microARN. Después, estos 4 microARN consenso se transfectaron en células MSTO o H28 a concentraciones variables y el efecto sobre el crecimiento celular se evaluó como anteriormente. La Figura 4 muestra que los 4 miméticos basados en la secuencia consenso miR-15/107 fueron más inhibidores del crecimiento que la secuencia nativa de miR-16. Esto indica que las secuencias consenso son candidatos terapéuticos más prometedores que el miR-16 nativo.

#### 10 Ejemplo 4

Transfección con miR-16 Regula Negativamente los Genes Diana

15 Los microARN son responsables de la regulación génica postranscripcional. Aun cuando el principal mecanismo de acción de los microARN es a través de la inhibición de la traducción del ARNm en proteína, con frecuencia esto conduce a la desestabilización del ARNm diana. Por lo tanto, la capacidad de un microARN para regular la expresión génica de las dianas previstas puede medirse mediante el análisis de los niveles del ARNm diana después de la modulación del microARN de interés. Las dianas reguladas de esta manera son entonces los candidatos para los genes implicados en los efectos fenotípicos observados después de la transfección del mimético de microARN. Aquellos genes además regulados negativamente al nivel de proteína se consideran que son con mayor probabilidad las verdaderas dianas del microARN.

25 Para vincular los efectos de la transfección de los miméticos con la biología celular de células de MPM, se midió la expresión de 24 genes candidatos a dianas de miR-16 en células de MPM tratadas con mimético de miR-16 (Figura 5). Las células H28 y MSTO se transfectaron de forma inversa en placas de 6 pocillos, con mimético de miR-16 o control (5 nM en cada caso) según el método descrito para el Ejemplo 3. Después de 48 horas de transfección, el ARN se aisló mediante el uso de TriZOL y se cuantificó mediante el uso de un nanofotómetro (Implen, Múnich, Alemania). A partir de pocillos replicados, se aislaron las proteínas y se cuantificó mediante el ensayo de proteína Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific). Para la síntesis de ADNc se usaron 250 ng de ARN como molde, con una mezcla de oligos aleatorios y oligodT como cebadores. Después este ADNc se usó como molde en 10 µl de la reacción de qPCR con los cebadores específicos para las dianas previstas de miR-16, mediante el uso de la mezcla química Brilliant II SYBR green (Agilent Technologies) según las instrucciones del fabricante, y la reacción se realizó en una máquina de PCR a tiempo real MX3000P (Agilent Technologies). Los resultados del qPCR se analizaron mediante el método  $\Delta\Delta Ct$ , por lo que la expresión del gen diana se normalizó para la expresión de 18S, y los resultados de las células transfectadas con los miméticos se expresaron con relación a la expresión normalizada de las dianas en células transfectadas con el control. Estos resultados demostraron una regulación negativa en 24 dianas que varía de 1.2 a 4 veces. A nivel de proteína, la expresión de CCND1 y Bcl-2 se analizaron mediante transferencia western. Las proteínas (20 µg) se separaron en un gel premoledado de poliacrilamida al 10% (Mini Protein TGX Precast Gels, Biorad) y se transfirieron a membranas de PVDF mediante el uso del sistema Trans-Blot Turbo Transfer (Biorad, NSW, Australia). Las membranas se bloquearon mediante el uso de leche en polvo y después se les adicionaron las sondas, consistentes en los anticuerpos específicos de las dianas, (Bcl-2; CCND1), seguido de la detección con un anticuerpo secundario específico de conejo o ratón (todos los anticuerpos de Cell Signaling Inc). Se usó quimioluminiscencia (estuche Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific) para detectar la presencia de las proteínas y se midieron mediante el uso de un sistema de obtención de imágenes Kodak Geologic 2200. La expresión de beta-actina ( $\beta$ -actina) se incluyó para controlar la carga igualitaria de las proteínas. La expresión de proteínas, tanto de CCND1 como de Bcl-2, se redujo significativamente en células tratadas con miR-16 en comparación con los controles (Figura 5). En conjunto, estos cambios en la expresión de ARNm y proteínas muestran que los efectos fenotípicos observados de la transfección de los miméticos de miR-16 se relacionan con los genes involucrados en la proliferación y la respuesta apoptótica alterada.

#### 50 Ejemplo 5

Efectos de miR-16 sobre la Toxicidad de Gemcitabina y Pemetrexed en Células de MPM

55 El MPM se considera resistente a la quimioterapia, y se cree que esta resistencia se relaciona con los cambios en las respuestas apoptóticas de las células tumorales. Como muchos de las dianas previstas de la familia miR-15/107 son genes relacionados con estos procesos, podría predecirse que los miméticos de microARN sensibilizarían las células del MPM a los fármacos de quimioterapia. Esto se evaluó para la combinación de miR-16 y los fármacos gemcitabina y pemetrexed (Figura 6).

60

Para evaluar el efecto de restaurar la expresión de miR-16 sobre la toxicidad de fármacos, la línea celular mesotelial normal MeT-5A (A, D) y dos líneas de MPM - MM05 (B, E) y MSTO-211H (C, F) - se transfectaron con miR-16 1 o 5 nM (símbolos cerrados) o mimético control (símbolos abiertos) en placas de 96 pocillos como se describió en el Ejemplo 3. Después de esto, el medio se sustituyó después de 24 horas con medio que contiene una dilución en serie de pemetrexed (1.95 a 500 nM) o gemcitabina (0.625 a 160 nM) con cada concentración ensayada por triplicado. Después de 72 horas, las placas se recogieron y el contenido de ADN se midió como se describió en el Ejemplo 3. El crecimiento de las células expuestas al fármaco se normalizó con respecto a las células no tratadas, y se determinó la concentración que inhibe el crecimiento en un 50 % (valor IC<sub>50</sub>). Los efectos de miR-16 sobre la sensibilidad del fármaco se determinaron mediante la comparación de los valores de IC<sub>50</sub> en las células transfectadas con el mimético y el control. Esto se demostró en la Figura 6 que muestra una sensibilización de 2 a 5 veces, en dependencia de la dosis, de las células MM05 (B, E) y MSTO-211H (C, F) para ambos fármacos, pero no hay efecto sobre las células normales MeT-5A (A, D).

#### Ejemplo 6

#### 15 Efectos de la Sustitución de miR-16 en MPM *in vivo*, Suministrado como VectEDVmiR-16

Los efectos inhibitorios sobre el crecimiento (y otros) observados después de la restauración de la pérdida de la expresión de los microARN supresores de tumor en el cáncer sugiere que ellos representan dianas terapéuticas novedosas. Para investigar esta posibilidad, esto debe evaluarse en modelos preclínicos de ratones. Sin embargo, para replicar estos efectos *in vitro* en la situación *in vivo* los miméticos de microARN deben superar los obstáculos que limitan el suministro a las células dentro del tumor, donde tienen su efecto terapéutico. Aquí, el suministro de miR-16 o miméticos consensuó un enfoque de direccionamiento con minicélulas. Las minicélulas son nanopartículas derivadas de la división no sincrónica de bacterias, como se describió anteriormente en referencia a la pub. de la patente de los EE.UU. Núm. 2011/0111041.

*La eficacia in vivo* de la restauración de miR-16 se evaluó en un modelo de xenoinjerto subcutáneo humano de MPM en ratones desnudos (Figuras 7 & 8). Los ratones atímicos (*nu/nu*) (de 4-6 semanas de edad) se adquirieron del Animal Resources Centre (Perth Western Australia) y todos los experimentos con animales se aprobaron por el Comité de Ética Animal de los Distritos de la Salud Locales de Sydney, Concord y RPAH. Las células MSTO se cultivaron y  $1.5 \times 10^6$  células en 50  $\mu$ l de medio libre de suero junto con 50  $\mu$ l de matrigel pobre en factores de crecimiento (BD Biosciences) y se inyectaron subcutáneamente entre los omóplatos. Se determinó el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) mediante las mediciones de largo (l) y ancho (w) y se calculó el volumen ( $V = lw^2/2$ ) como se describió, en los días indicados. Los tratamientos experimentales y controles se realizaron una vez que los volúmenes tumorales fueron de 100 mm<sup>3</sup>, en cuyo momento la masa tumoral era claramente palpable y vascularizada, como se determinó después de la escisión y el examen histológico de los tumores. Los ratones se aleatorizaron en diferentes grupos antes de comenzar los diversos tratamientos. Todas las mediciones de volumen tumoral se realizaron por un investigador que desconocía los tratamientos administrados.

Se realizaron tres experimentos. En el primer experimento, los ratones se trataron en los días indicados, con la dosis indicada de  $1 \times 10^9$  minicélulas que contenían miR-16- o control, durante 1, 2 o 4 veces por semana (Figura 7). En el transcurso del experimento los tumores en los ratones control (tratados con solución salina o minicélulas vacías) aumentaron de 100 a 400 mm<sup>3</sup>. En los ratones que recibieron el mimético de miR-16 los tumores crecieron más lentamente y los efectos fueron dependientes del número de tratamientos. Los ratones portadores de tumores que recibían 1 dosis por semana tenían tumores que crecían más lentamente que aquellos de los ratones tratados con control, y esta inhibición del crecimiento se mantuvo hasta el día 30, en cuyo punto el tamaño de estos tumores fue similar al de los controles. Los ratones que recibieron 2 dosis por semana tuvieron tumores que aumentaron de tamaño hasta aproximadamente 200 mm<sup>3</sup> al final del experimento en el día 33, y en todo momento eran considerablemente más pequeños que los de los ratones que recibieron minicélulas control. Los ratones tratados 4 veces por semana tenían tumores que no aumentaron de tamaño durante la primera semana después de la administración inicial del mimético de miR-16. Al final del experimento, estos tumores aumentaron de tamaño hasta solo 170 mm<sup>3</sup>, lo que corresponde a una inhibición del crecimiento del 75 % en comparación con los controles.

En el segundo experimento, los ratones se trataron 4 veces por semana con una dosis de  $2 \times 10^9$  minicélulas cargadas con miR-16 o control (Figura 7). En este experimento, los tumores en los ratones tratados con minicélulas control crecieron a una velocidad comparable a aquellos del primer experimento que recibieron la mitad de la dosis. En los ratones que recibieron la dosis incrementada de miR-16, hubo un marcado aumento en el efecto antitumoral del mimético de miR-16. En la fase inicial después del tratamiento, el volumen de estos tumores disminuyó a partir del punto de partida de 100 mm<sup>3</sup>. A partir de ahí, el volumen del tumor se mantuvo alrededor de 80 mm<sup>3</sup> y, a pesar de un ligero aumento después del cese del tratamiento en el día 26 y al final del experimento en el día 29, se mantuvo por debajo de 100 mm<sup>3</sup>. Esto corresponde a una inhibición completa del crecimiento tumoral en estos animales tratados con miR-16, en comparación con los grupos tratados con solución salina y control.

En el tercer experimento, los ratones se trataron 4 veces por semana con una dosis de  $1 \times 10^9$  minicélulas cargadas con el mimético con 15/107.2 o control, y los tratamientos comenzaron una vez que el tumor alcanzó un promedio de 100 mm<sup>3</sup> (Figura 8). En este experimento, los tumores en los ratones tratados con minicélulas control crecieron a una tasa

5 similar al primer experimento, con una ligera reducción en el crecimiento en comparación con los tumores en los ratones tratados con solución salina. En ratones que recibieron el mimético con15/107.2, hubo un claro efecto antitumoral. Durante los primeros 10 días del experimento, que corresponde a 8 tratamientos, el volumen de los tumores estaba por debajo del tamaño inicial de 100 mm<sup>3</sup>. A partir de entonces, el volumen tumoral aumentó gradualmente hasta aproximadamente 150 mm<sup>3</sup> al final del experimento, en comparación con 250 y 225 mm<sup>3</sup> en los ratones tratados con solución salina o control, respectivamente.

10 La inhibición del crecimiento de tumores de xenoinjertos derivados de MSTO-211H observados en ratones después de la administración de <sup>Vect</sup>EDV<sub>miR-16</sub> o <sup>Vect</sup>EDV<sub>con15/107.2</sub> es excepcionalmente fuerte y supera la inhibición observada *in vitro* en cultivos de las mismas (y otras) células de MPM (compare la Figura 3 con las Figuras 7 y 8). Esto es notable al considerar el hecho de que *in vitro* >95 % de las células se transfectan con el mimético de miR, mientras que *in vivo* es probable que el número de células tumorales que reciben el mimético sea ≤ 10 %.

15 Se cree que el efecto observado es causado por los efectos inhibidores de miR-16 (y otros miembros de la familia) en células endoteliales, de esta manera se dirigen efectivamente tanto a células tumorales como a células estromales involucradas en la angiogénesis, que se requiere para el crecimiento tumoral. Los efectos inhibidores del crecimiento del tratamiento mimético en el modelo de xenoinjerto subcutáneo son mayores que los efectos informados para otros tratamientos sistémicos en el mismo modelo.

20 La presente invención se adapta bien para alcanzar los fines y ventajas mencionados, así como también aquellos que son inherentes a esta.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un mimético de microARN de doble cadena que comprende:  
(a) una secuencia madura correspondiente a un miembro de la familia miR-15/107; y  
(b) una cadena pasajero,  
en donde la secuencia madura contiene AGCAGC en las posiciones 2-7 o 1-6 en el extremo 5' y en donde la secuencia madura comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en las sec. con núm. de ident.: 11-14.
- 10 2. El mimético de microARN de doble cadena de la reivindicación 1, en donde la cadena pasajero comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núm. de ident.: 15-18.
- 15 3. El mimético de microARN de doble cadena de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la cadena pasajero se inactiva mediante modificación química.
4. Un mimético de microARN de doble cadena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para usar en el tratamiento del mesotelioma pleural maligno (MPM).
- 20 5. El mimético de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el mimético se proporciona para la administración con una minicélula.
6. El mimético de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde el mimético se proporciona para la coadministración simultáneamente o en serie con una terapia anticancerosa adjunta.
- 25 7. Un mimético de microARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para usar en el aumento de la sensibilidad de una célula cancerosa de MPM a una terapia anticancerosa.

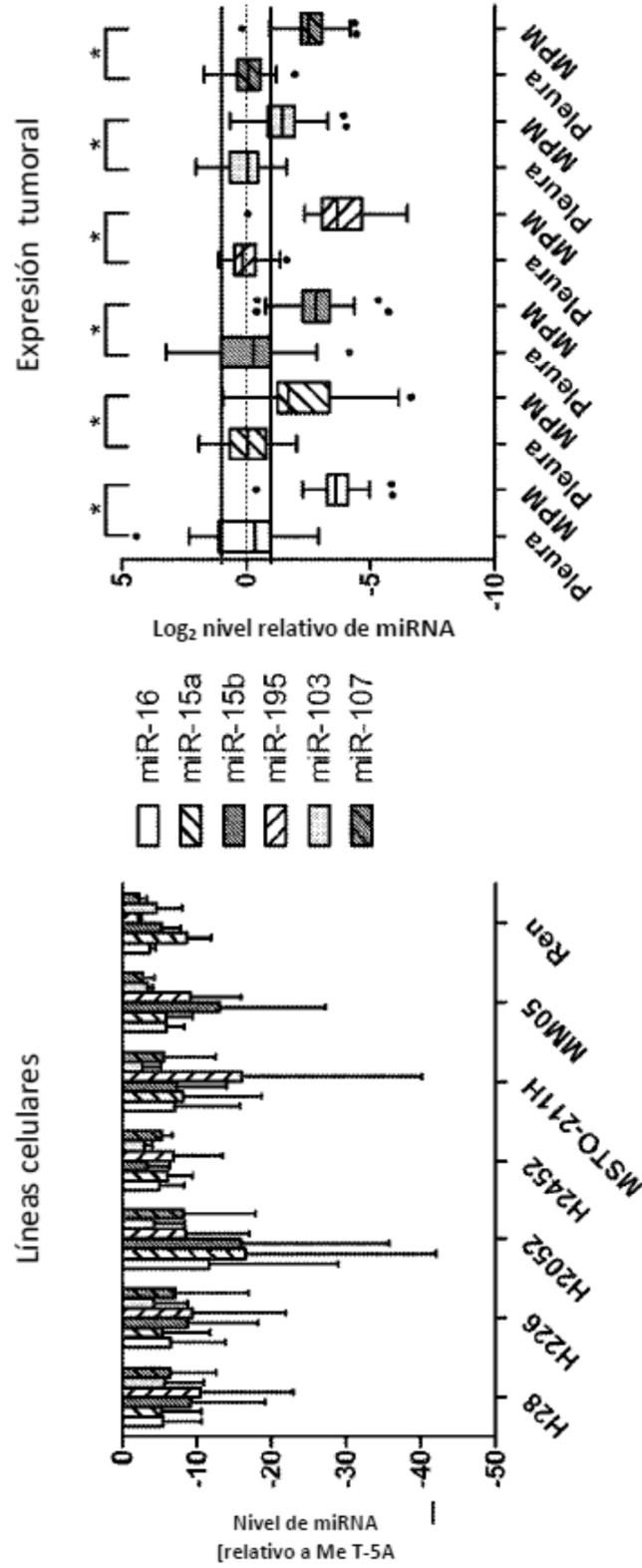


Figura 1

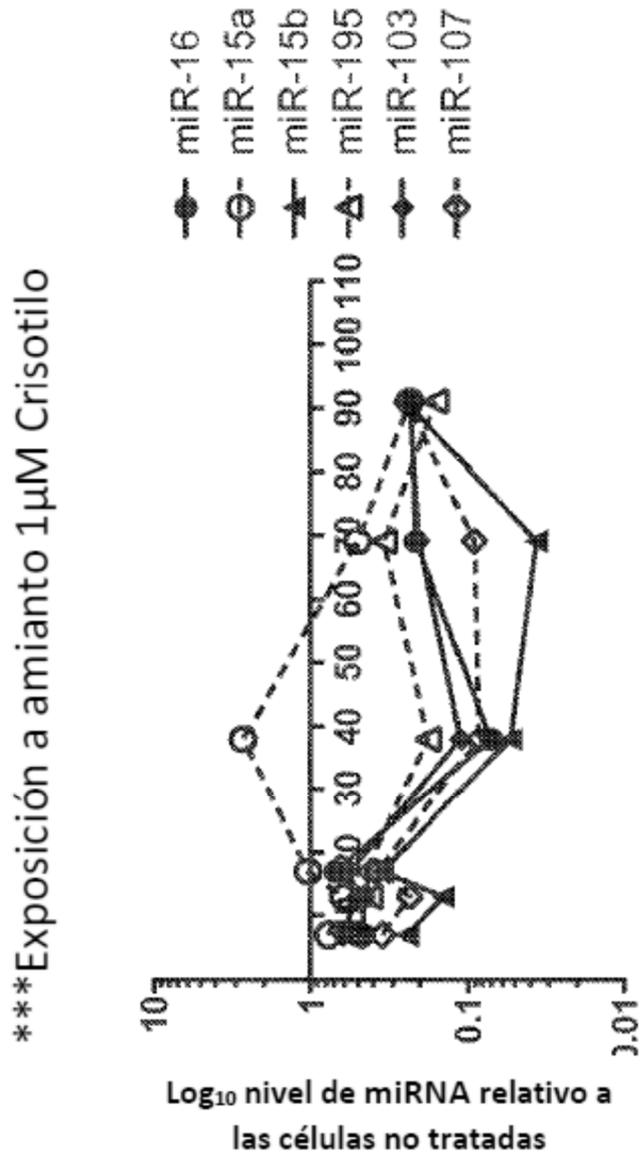


Figura 2

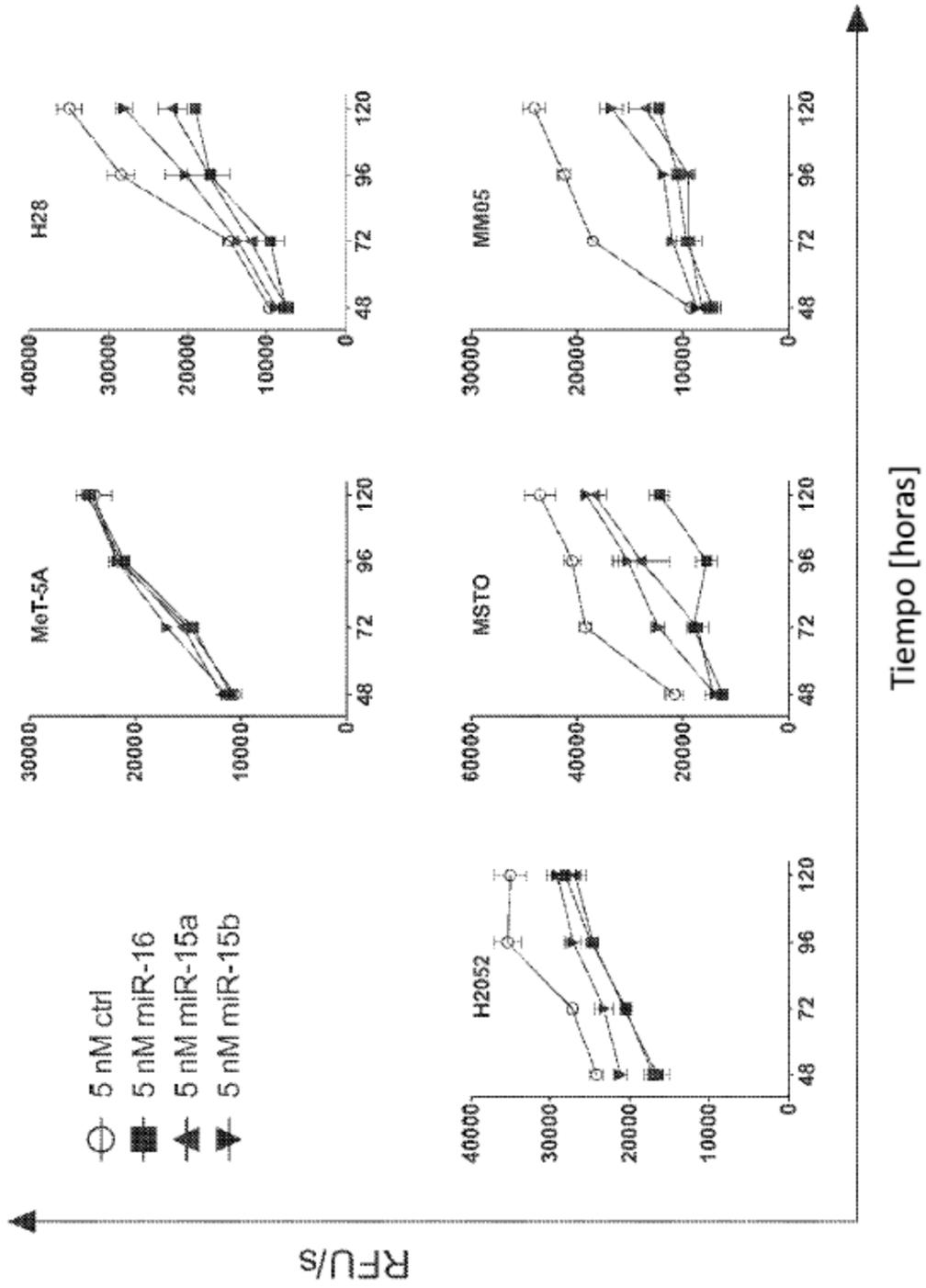


Figura 3

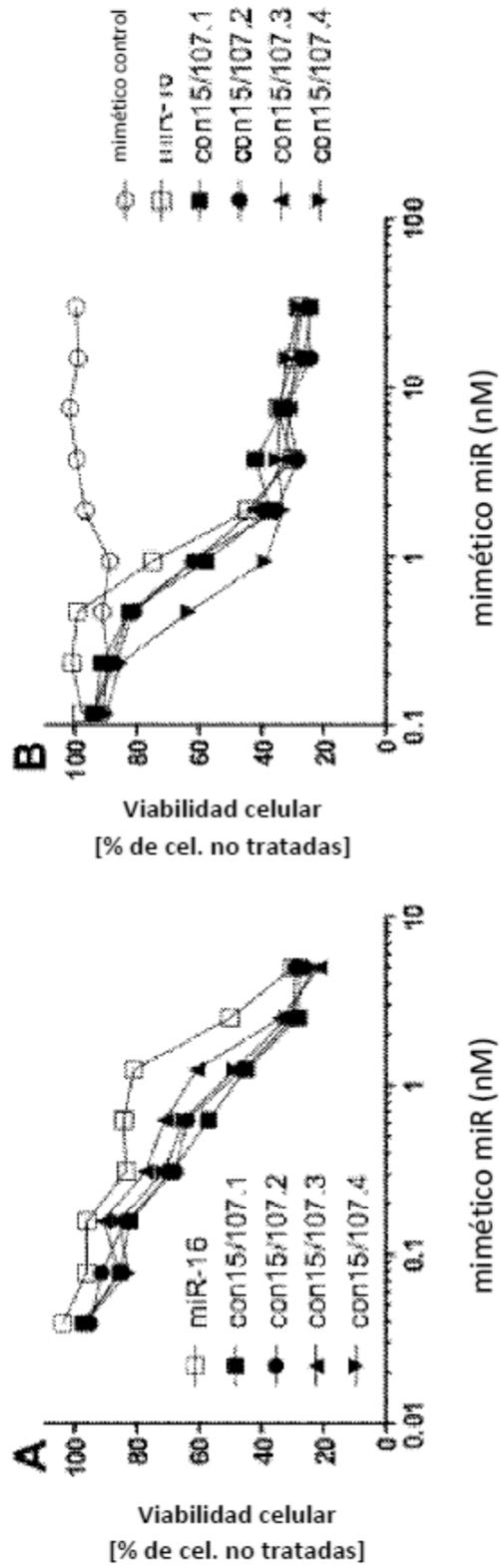


Figura 4

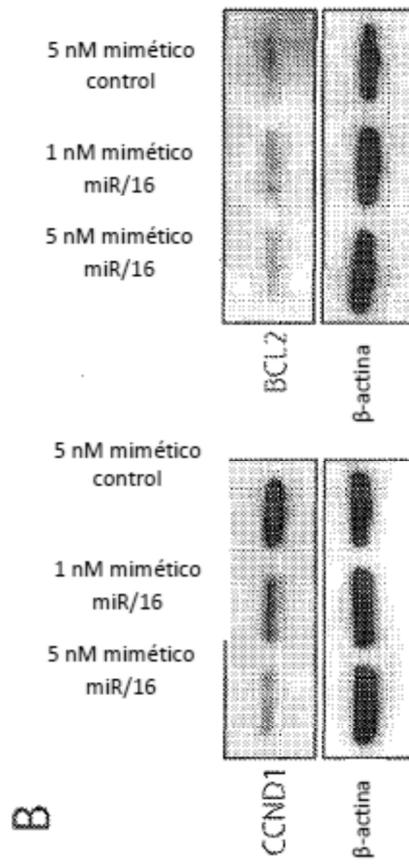
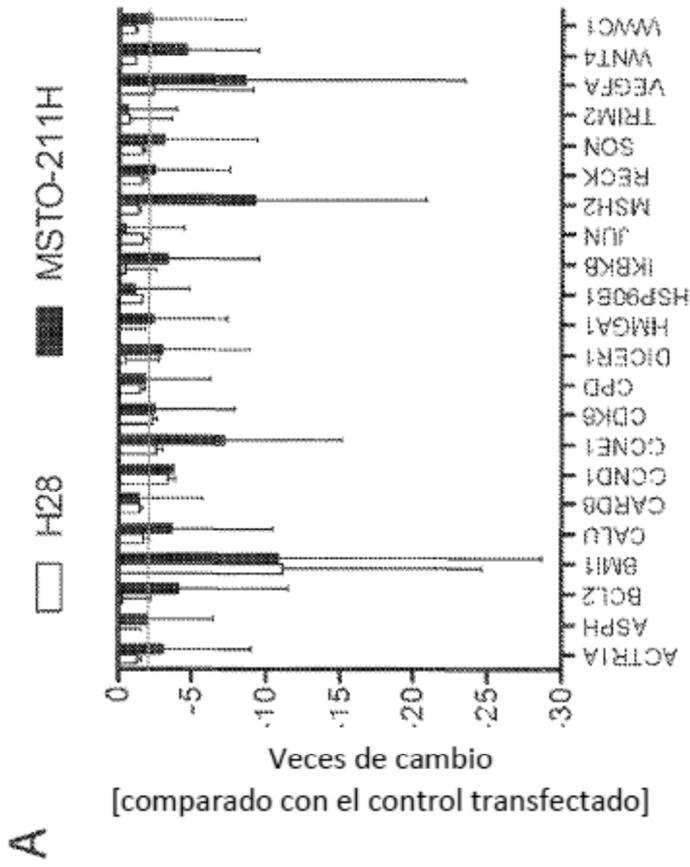


Figura 5

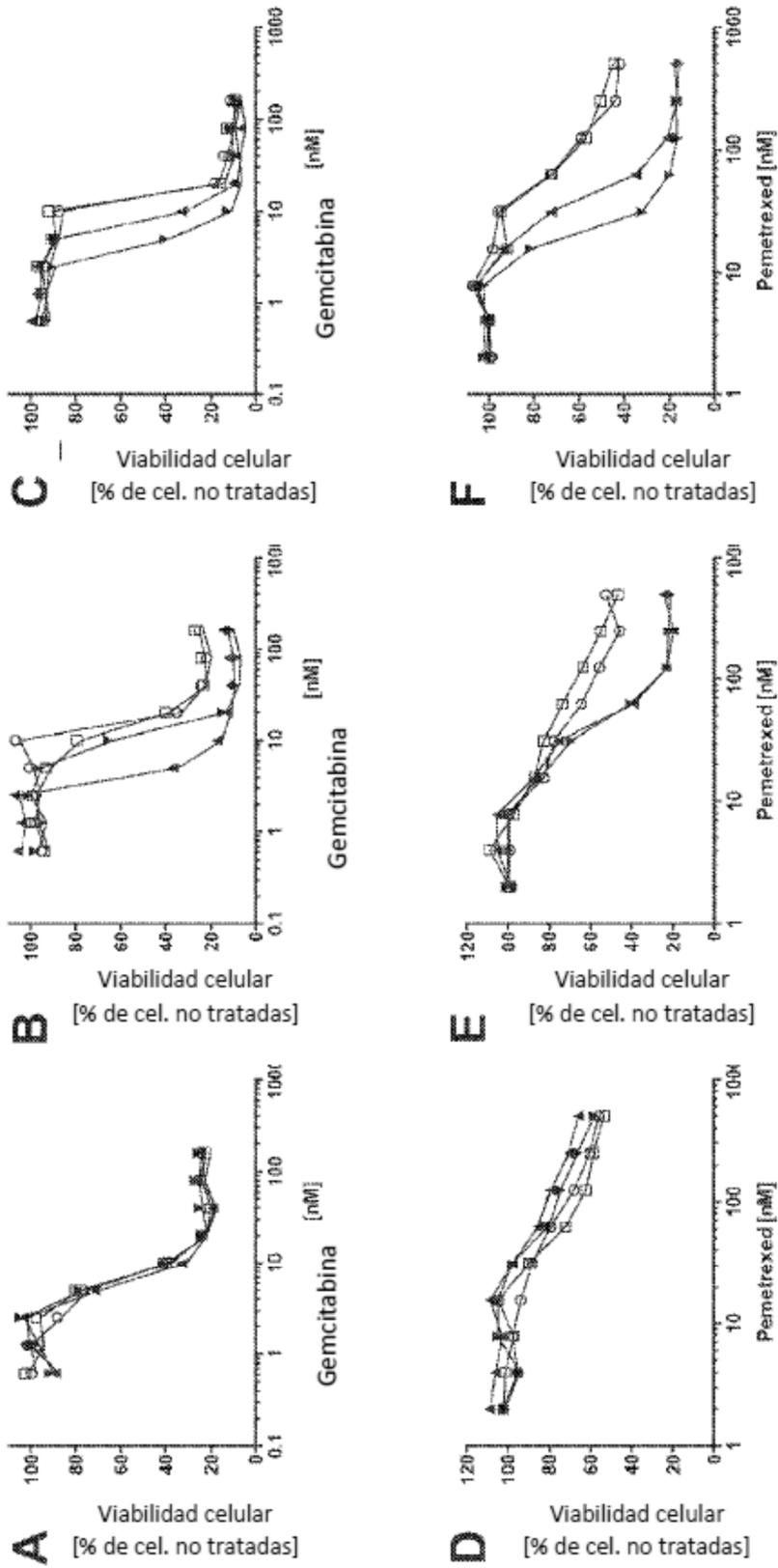


Figura 6

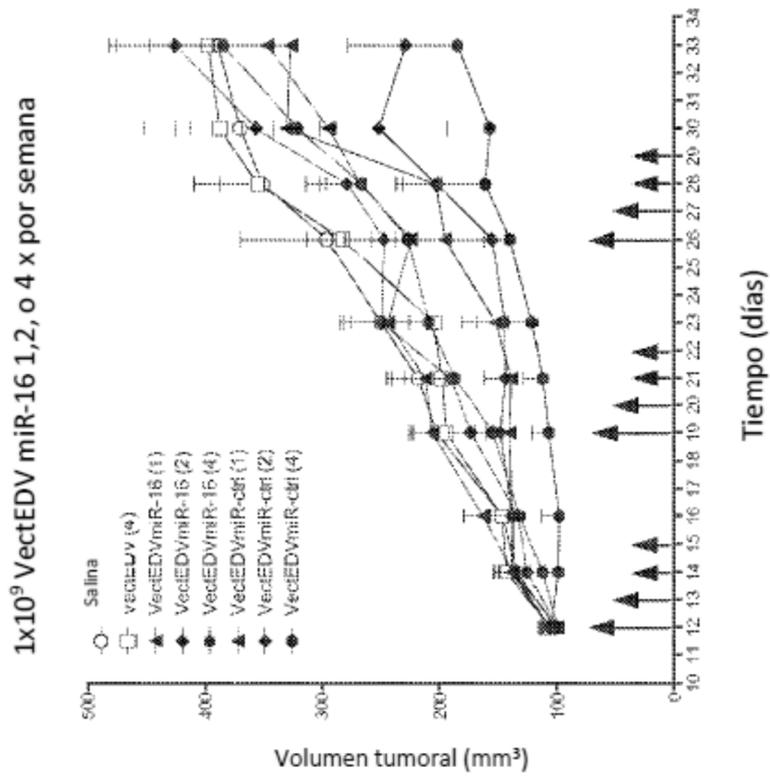
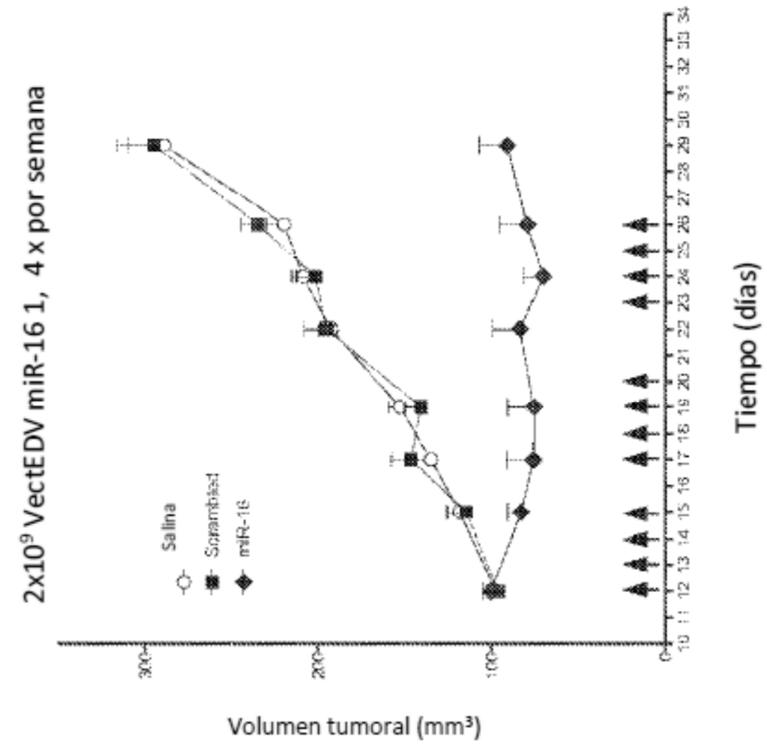


Figura 7

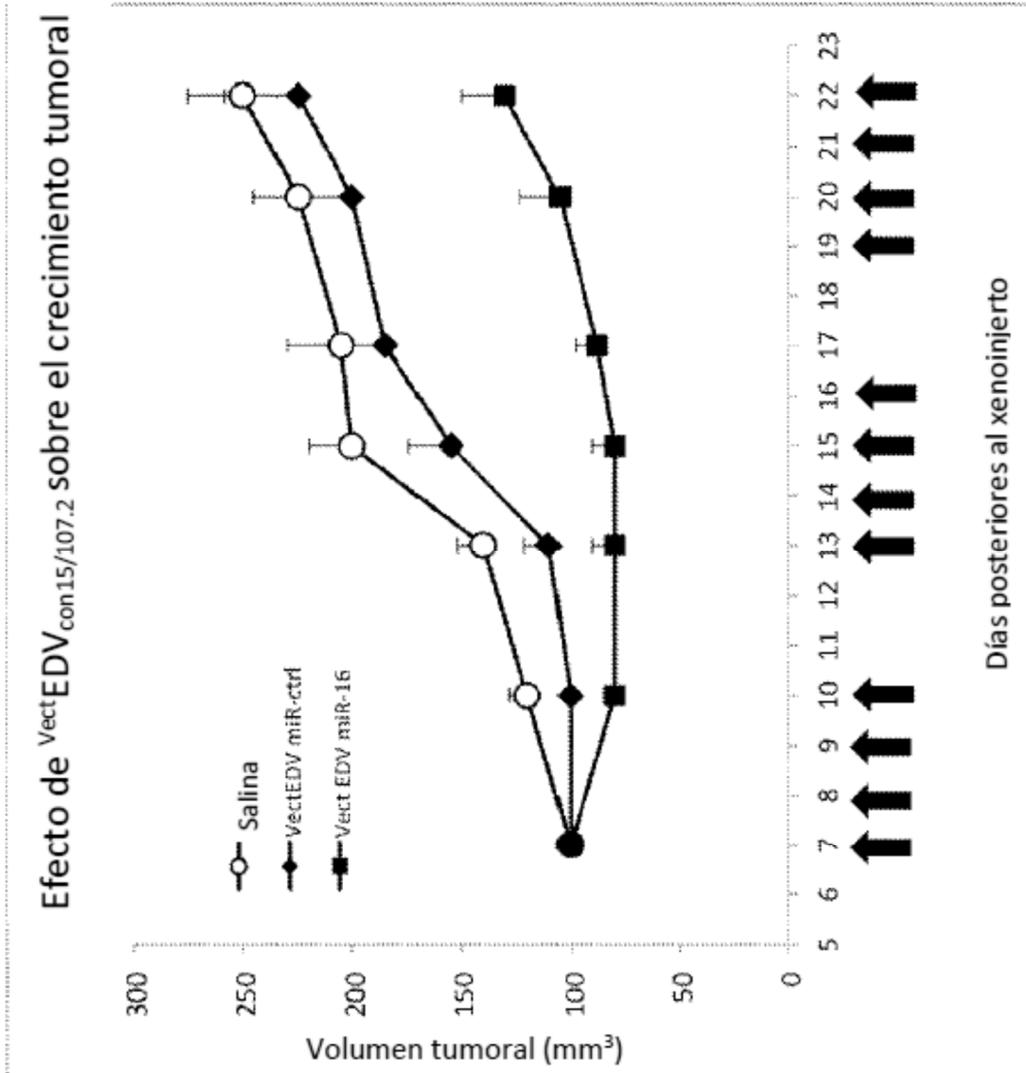


Figura 8